

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**Дипломний проєкт**

**на здобуття ступеня бакалавра**

**за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»**

**спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Технологія виробництва іммобілізованого ензиміотику**

**косметичного призначення. Дільниця біосинтезу»**

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-62

Рижкова Тетяна Сергіївна \_\_\_\_\_

Керівник:

Зав. каф. промислової біотехнології, д.т.н., доц

Тодосійчук Тетяна Сергіївна \_\_\_\_\_

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення  
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович \_\_\_\_\_

Рецензент:

Ст. викладач каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Жукова Вероніка Сергіївна \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цьому дипломному  
проєкті немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) \_\_\_\_\_

Київ – 2020 року

## ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6213 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Розробн.	Рижкова Т.С.				1	1
Керівн.	Тодосійчук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.	Фесенко С.В.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«\_27\_» лютого 2020 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на дипломний проєкт студенту**  
**Рижковій Тетяні Сергіївні**

1. Тема проєкту «Технологія виробництва іммобілізованого ензиміютика косметичного призначення. Дільниця біосинтезу.», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, к.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Streptomyces albus* 2435/M; ферментер для промислового культивування - об'єм 2 м<sup>3</sup>; параметри культивування:  $t = 28 \pm 1$  °C, аерація,  $\tau = 60$  год; спосіб очистки продукту – іммобілізація на цеоліті; кінцевий продукт – сухий порошок в поліетиленових пакетах по 0,5 кг.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва іммобілізованого ензиміютику; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити

основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

#### 6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	27.02.20-25.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	26.03.20-15.04.20	
3.	Технологічна схема (проєкт на А4 – принциповий перелік стадій)	26.03.20-15.04.20	
4.	Апаратурна схема (проєкт на А4 – схематичний перелік обладнання)	26.03.20-15.04.20	
5.	Методи отримання промислових продуцентів	16.04.20-30.04.20	
6.	Технологічна частина	01.05.20-15.05.20	
7.	Технологічна схема (креслення)	01.05.20-15.05.20	
8.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	16.05.20-30.05.20	
9.	Апаратурна схема (креслення)	16.05.20-30.05.20	
10.	Оформлення пояснювальної записки	31.05.20-05.06.20	
11.	Подання готової роботи на рецензію та до екзаменаційної комісії	06.06.20-10.06.20	

Студент

Тетяна РИЖКОВА

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка  
до дипломного проєкту  
на тему: «Технологія виробництва іммобілізованого  
ензимиотику косметичного призначення. Дільниця  
біосинтезу»**

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить: 104 ст., 20 рис., 8 табл., 3 кресл., 124 посилання.

Робота присвячена розробці технології виробництва іммобілізованого ензиміотику для використання в складі функціональної косметичної продукції. З метою підвищення біосинтетичної активності обраного продуцента *Streptomyces albus* запропонована схема селекції, що включає обробку вихідної культури мутагеном нітрозометилсечовиною та наступний відбір активного штаму.

На основі аналізу розробок з використанням обраного продуценту розроблено склад поживного середовища з використанням меляси в якості карбонового субстрату. Для підвищення стабільності каталітичної активності ензиміотику та розширення спектру його дії використаний метод іммобілізації на цеоліті.

На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано ферментер із механічним перемішуючим пристроєм та барботером, які забезпечують надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході виробничого біосинтезу. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва ензиміотику відповідно до вимог до готової форми.

Використання вищезазначених методів дозволило отримати кінцевий продукт активністю 30 тис. МО/г з антисептичними та відлущуючими властивостями, що визначає його використання у регенеративних косметичних засобах.

*STREPTOMYCES ALBUS* 2435/М, ЕНЗИБІОТИКИ, ЦЕОЛІТ, ІММОБІЛІЗАЦІЯ, КОСМЕТИКА, ФЕРМЕНТИ, АНТИМІКРОБНИЙ ЕФЕКТ, БІОРЕАКТОР.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Рижкова Т.С.				Д	5	109
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Затвер.						ФБТ		

## ABSTRACT

Thesis project contains: 104 articles, 20 figures, 8 tables, 3 drawings, 124 references.

The work is devoted to the development of technology for the production of immobilized enzybiotic for use in functional cosmetic products. In order to increase the biosynthetic activity of the selected producer of *Streptomyces albus*, a selection scheme is proposed, which includes treatment of the original culture with a mutagen of nitrosomethylurea and subsequent selection of the active strain.

Based on the analysis of developments using the selected producer, the composition of the nutrient medium using molasses as a carbon substrate was developed. To increase the stability of the catalytic activity of the enzybiotic and expand the spectrum of its action, the method of immobilization on zeolite was used.

Based on the physiological and biochemical characteristics of the producer, a fermenter with a mechanical stirring device and a bubbler was selected, which ensure the flow of oxygen to the culture and efficient mass transfer during production biosynthesis. The technological and apparatus scheme of production of enzybiotic according to requirements to the ready form is developed.

The use of the mentioned methods allowed to obtain the final product with an activity of 30 thou. IU/g with antiseptic and exfoliating properties, which determines its use in regenerative cosmetics.

*STREPTOMYCES ALBUS* 2435/M, ENSIBIOTICS, ZEOLITE, IMMOBILIZATION, COSMETICS, ENZYMES, ANTIMICROBIAL EFFECT, BIOREACTOR.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Рижкова Т.С.				Д	6	109
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ .....	9
ВСТУП .....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1 Основні промислові продуцента.....	12
1.2 Систематичне положення .....	14
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки .....	14
1.4 Культуральні ознаки.....	17
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки .....	18
1.6 Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів.....	22
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	25
2.1 Характеристика кінцевого продукту .....	25
2.2 Схема хімічних перетворень.....	27
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату отриманого в процесі реалізації технології.....	30
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	31
2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси .....	38
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	40
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту .....	40
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	43
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі .....	46
РОЗДІЛ 4.ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	47
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	47
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві .....	48
4.3 Опис технологічного процесу.....	53

					<i>ДП 6213. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Рижкова Т.С.</i>			<i>ЗМІСТ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>7</i>
						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>	
<i>Керівник</i>		<i>Тодосічук Т.С.</i>					
<i>Затвер.</i>							<i>Аркушів</i>
							<i>109</i>



4.4 Матеріальний баланс .....	63
4.5 Контроль виробництва .....	64
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ТА ПРОВЕДЕННЯ	
ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ .....	70
5.1 Обґрунтування обраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату. ....	70
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічні розрахунки .....	74
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання .....	88
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища .....	89
ВИСНОВКИ .....	94
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	96
ДОДАТКИ .....	110

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ПС – поживне середовище;

ПЕГ – поліетиленгліколь;

А – аеросил;

ПОЕ – поліоксиетилен;

ГК – гістидин кіназа;

МНС - N-метил-N-нітрозометилсечовина;

ФБ – фосфатний буфер;

ІЛА – індекс літичної активності;

ПМ – посівний матеріал;

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ		
Розробив		Рижкова Т.С.					
Консульт.							
Керівник		Тодосічук Т.С.					
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

## ВСТУП

Ферменти, унікальні білкові молекули, що каталізують більшість реакцій у живих організмах, справедливо називають каталітичними механізмами живих систем. Спектр використання ферментів і ферментних препаратів є надзвичайно широким, і зосереджений в багатьох різних сферах промисловості. Однією з важливих і потенційно вигідних сферою використання ферментів є косметична галузь, що пов'язано з різноманітними функціями, що можуть виконувати ферменти як компоненти косметичних засобів. Так, використання ензимів в складі косметичної продукції дозволяє надати готовому товару відлущуючих, зволожуючих та антиоксидантних властивостей.

Останнім часом значного поширення набуває використання в якості функціонального компонента косметичних засобів ензимиотиків – ферментів, що здатні руйнувати клітинну стінку мікроорганізмів, забезпечуючи тим самим антибактеріальний і бактеріостатичний ефект без ризику виникнення і розвитку антимікробної резистентності. Це забезпечує можливість їх застосування як в лікувальній косметиці, так і в засобах для щоденного догляду за шкірою.

На даний момент більшість ферментних препаратів на ринку субстанцій для виробництва косметичних засобів представлені ензимами рослинного походження. Проте, технологічний процес виділення і очистки даних ферментів є доволі складним і дорогавартісним. В якості потенційної заміни даним речовинам була розроблена технологія отримання ензимів мікробного походження, що дозволяє отримати більшу кількість цільового продукту за меншою вартістю. Крім того, можливість підвищення біосинтетичної активності продуцентів (за рахунок використання методів селекції і оптимізації складу поживного середовища), розробки нових

					ДП 6213. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Рижкова Т.С.				Д	10	109
Консульт.								
Керівник		Тодосічук Т.С.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

технології обробки культуральної рідини і методів виділення і очистки цільового продукту дозволяє в подальшому збільшити масштаби і продуктивність виробництва, при цьому не впливаючи кардинально на собівартість кінцевого продукту і затрати на його отримання.

Тому метою проекту була розробка ефективної технології виробництва ензиміотику мікробного походження для використання в функціональних косметичних засобах як антисептичного та відлущуючого агенту. Спектр потенційної продукції з кінцевим продуктом виробництва, що розробляється, є досить широким і включає в себе засоби для щоденного очищення шкіри, пілінги та зволожуючі креми.

Завданнями, які поставлені для досягнення даної мети, є:

1. Огляд існуючих продуцентів ензиміотиків та обрання оптимального біологічного агенту для отримання цільового продукту і надання повної характеристики продуцента.

2. Визначення характеристик цільового продукту, враховуючи механізм дії, фізіолого-біохімічні властивості, компонентний склад і ступінь очистки.

3. Аналіз можливих способів виділення і очистки ензимних препаратів та вибір оптимального технологічного рішення для даного цільового продукту з урахуванням його особливостей, призначення і функції в косметичних засобах.

4. Розробка технологічної і апаратурної схеми отримання іммобілізованого ензиміотику.

5. Обґрунтування вибору ферментера для проведення виробничого культивування продуцента з висвітленням його конструктивних особливостей. Розрахунок обраної конструкції, що включає тепловий, технологічний і конструкційний розрахунок самого ферментера, а також його складових (турбінна мішалка і барботер) .

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 1.1 Основні промислові продуценти

Ензибіотики відносяться до нового класу антибіотичних речовин і являють собою різні типи ферментів, що здатні до деградації клітинної стінки мікроорганізмів, проявляючи таким чином антибактеріальну та/або протигрибкову активність [1].

До ензибіотиків відносять літичні ферменти, які природним чином присутні у вірусах, бактеріях і в біологічних рідинах організму, таких як сльози, слина та секрет слизових оболонок. До них належать лізини, бактеріюцини, аутолізини та лізоферменти, які в основному відносяться до класу пептидогліканових гідролаз. Лізини отримують із бактеріофагів та бактеріюцинів, тоді як аутолізини отримують із заражених фагом бактерій [1].

За рахунок механізму своєї дії, що передбачає деградацію клітинної стінки без розвитку резистентності мікроорганізмів, ензибіотики набувають поширеного використання в усіх сферах промисловості, включаючи не тільки медицину і фармацевтичне виробництво, а й також косметологію.

Сьогодні в різних сферах промисловості відомими продуцентами ензибіотиків можуть виступати різні представники мікроорганізмів, включаючи бактерії, гриби та актиноміцети. Серед бактерій в якості джерел ензибіотиків можуть виступати представники виду *Bacillus cereus*, що продукують ендолізини LysB4, LysPBC2, LysPBS13 та ін. [2–4]. Також поширеними є ендолізини PlyL та Ply21, які продукуються іншим видом *Bacillus*, *B. anthracis* [5]. Дані ензибіотики здатні розщеплювати клітинну стінку кількох видів *Bacillus* при екзогенному застосуванні [6]. Розвиток сучасних технологій дозволив також отримати бактерію *Escherichia coli* в якості продуцента ендолізину PaP1, що дозволяє руйнувати *Pseudomonas*

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ		
Розробив		Рижкова Т.С.					
Консульт.							
Керівник		Тодосічук Т.С.					
Затвер.					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

*aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* [7].

Серед грибів в якості продуцентів ензиміотиків можна використовувати представників роду *Trichoderma*, а саме *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*. Вони здатні виробляти і виділяти гідролітичні ензими, що руйнують клітинну стінку патогенних грибів, забезпечуючи таким чином протифунгальну активність [8].

Актиноміцети також стали активно застосовуватися в промисловості в якості продуцентів, зокрема гідролітичних ферментів, антибіотиків та ензиміотиків. Особливо це стосується представників роду *Streptomyces*, який вже став об'єктом роботи селекціонерів і промислових біотехнологів. На даний момент пошук нових потенційних мікроорганізмів продуцентів роду *Streptomyces* продовжується. Були виділені нові культури стрептоміцетів видів *ambofaciens*, *albolongus*, *aburaviensis* і *pulvereceus*, що синтезують лужні протеази – ферменти, що часто застосовуються при виробництві побутово-косметичних засобів, оскільки працюють при рН 8–9 [9].

Іншим промислово важливими представниками стрептоміцетів є мікроорганізми виду *Streptomyces albus*, поширеними вторинними метаболітами якого є різноманітні ферменти, зокрема гідролітичні ферменти, такі як протеїнази, мурамідози а також оксидазний ензим тирозиназа [9–11]. Крім того, різні штами *S. albus* продукують ряд антибіотичних речовин, що можуть бути активними проти стафілококів та інших грампозитивних мікроорганізмів [12–13].

Цільовим продуктом даної роботи є іммобілізований ензиміотик косметичного призначення, в основі якого лежить комплекс бактеріолітичних ферментів. В якості продуценту був обраний мікроорганізм *S. albus*, який здатний до біосинтезу комплексу бактеріолізинів, що здатні руйнувати клітинну стінку сторонніх мікроорганізмів, забезпечуючи таким чином антимікробну літичну та протеолітичну активність.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

## 1.2 Систематичне положення мікроорганізму-продуценту

В якості мікроорганізму-продуценту в даній роботі використовують *S. albus*, первісно ідентифікований як *Streptomyces recifencis var lyticus* [14]. *S. albus* є представником *Streptomyces* – роду бактерій родини *Streptomycetaceae*, порядку актиноміцетів (*Actinomycetales*) класу *Thallobacteria* типу *Firmicutes* царства *Eubacteria*.

Оскільки *S. albus* відносять до роду *Streptomyces*, у 9 виданні визначника Берджі продуцент належить до групи «Стрептоміцети та близькі роди». Категорія – грампозитивні еубактерії [15].

## 1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Рід *Streptomyces* представлений нитчастими мікроорганізмами з розвиненими вегетативними розгалуженими гіфами (діаметром від 0,5 до 2,0 мкм). Представники цього роду, включаючи *S. albus*, здатні утворювати і повітряний, і субстратний міцелій [16]. Життєздатний субстратний міцелій росте всередині культурального середовища і отримує органічні сполуки з поживного середовища (ПС) в процесі біосинтезу [17]. Після відмирання з нього виникає репродуктивний (повітряний) міцелій. Та частина повітряного міцелію, що знаходиться на поверхні утворює спори шляхом септування з утворенням ланцюгів одноядерних компартментів, тоді як неспороутворюючий повітряний та субстратний міцелії зрештою гинуть (Рис. 1.1) [18].

Субстратний міцелій – це міцелій, який утворюється зі спор і розвивається приблизно до 35 годин культивування при температурі 28– 30 °С. У цей момент починається утворення повітряного міцелію і приблизно за 60 годин культивування починається процес спороношення [19]. Три міцеліальні типи (субстратний, повітряний та споровий) існують одночасно в певний час. Цей цикл характерний для всіх видів *Streptomyces*, хоча і з певними часовими варіаціями.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

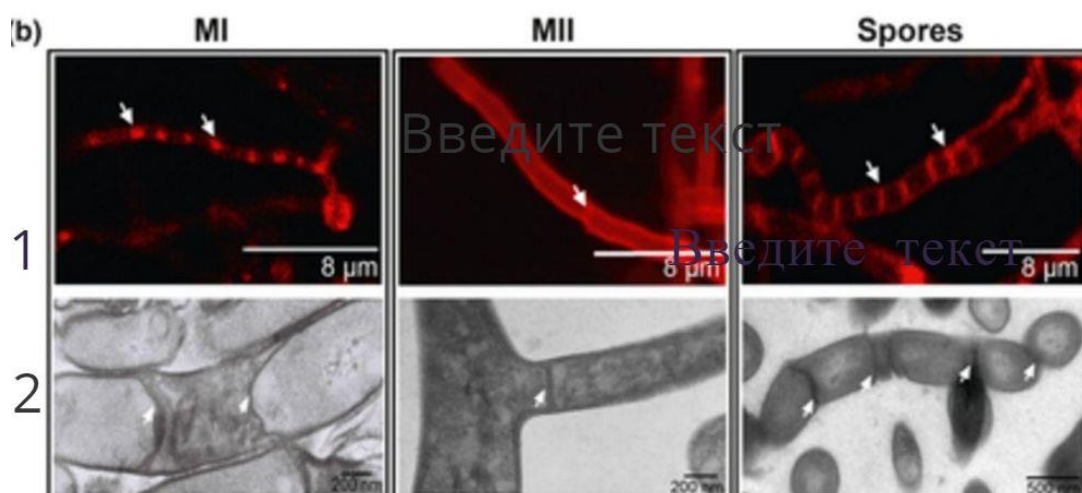


Рисунок 1.1. Процес розвитку субстратного і повітряного міцелію і спороутворення у стрептоміцетів при вирощуванні на рідкому (1) і твердому (2) поживному середовищі (MI – субстратний міцелій; MII – повітряний міцелій; Spores – спори) [20].

Спори продуцента формуються на повітряному міцелії і здатні утворювати прямі або спіральні ланцюжки, що складаються з трьох або більше нерухомих спор [21]. Даний процес відбувається в апікальній ділянці спороутворюючого гіфа, відділеного від базальної ділянки перегородкою. Діаметр гіф повітряного міцелію складає 0,7–0,9 мкм [22]. Спороносці короткі, неспіральні, майже прямі, у молодій культури ледь хвилясті з часто розміщеними розгалуженнями. Спори овальні, утворюються шляхом фрагментації (Рис. 1.2) [23].

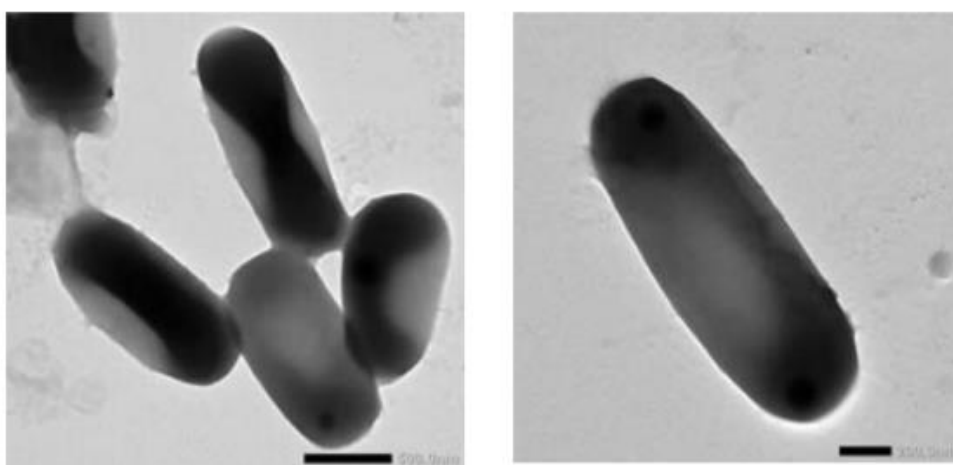


Рисунок 1.2. Електронні мікрофотографії поверхні спор *S. albus* [25].



Спороутворення лежить в основі розмноження стрептоміцетів. Розвиток виду починається з проростання спор, причому у різних ділянках спори проростають різною кількістю гіф, від однієї до чотирьох. Гіфи подовжуються, розгалужуються і розростаються в субстратний (первинний) міцелій, вростають в середу і формують колонії. На поверхні колонії розвивається вторинний (повітряний) міцелій. Він більш пухкий [24].

Оскільки *S. albus* належить до актиноміцетів, в якості запасних поживних речовин він містить гранули волютину, який утворюється і накопичується в залежності від складу середовища, умов зростання і віку культури, причому поява волютинових гранул супроводжується різким зниженням антибіотичної продуктивності міцелію. Волютин – не обов'язковий структурний елемент клітин актиноміцетів. Волютинові гранули з'являються зазвичай на більш пізніх стадіях розвитку культури в умовах порушеного балансу між окремими компонентами поживного середовища [26].

Волютинові гранули містять РНК і поліфосфати, що не розчинні в кислому середовищі. Причому склад волютину гіф різного віку неоднаковий: на ранніх стадіях розвитку культур він містить більшу кількість РНК, на більш пізніх стадіях основними компонентами волютину є поліфосфати.

Особливістю будови клітинної стінки *S. albus* 2435/М є наявність пептидоглікану типу А, в результаті чого утворюються характерні міжпептидні гліцеринові містки. Жирнокислотний склад клітинної стінки є типовим для стрептоміцетів, з переважанням насичених розгалужених кислот, кількість атомів карбону коливається в межах 12–19. Основний компонент жирнокислотного складу штаму – нерозгалужений ланцюг насиченої октадеканової (C18 : 0) кислоти, вміст якої становить 72,55%. Вміст інших насичених жирних кислот з нерозгалуженим вуглецевим ланцюгом (C16 : 0) становив 17,79%. Інші розгалужені насичені кислоти (іC14 : 0, іC15 : 0, цис-9, C17 : 0) практично відсутні. Слід зазначити, що в даному штамі не виявлено жирних кислот з подвійними зв'язками, у тому

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

числі мононенасичених кислот, які іноді є компонентами ліпідів стрептоміцетів [25].

#### 1.4 Культуральні ознаки

Характер росту *S. albus* 2435/М на щільних поживних середовищах відрізняється в залежності від віку культури. Колонії повільно зростають і часто мають ґрунтоподібний запах, в результаті синтезу летючого метаболіту, геосміну [27] Молодші за віком колонії сірі мають гладку сіру поверхню. Більш великі, старші колонії мають шорсткувату оксамитову поверхню (за рахунок утворення спор). Колонії прилягають до поверхні агару і відрізняються надзвичайно жорсткою консистенцією (Рис. 1.3) [28].



Рисунок 1.3. Характер росту *S. albus* на твердому поживному середовищі [28].

Пігментація повітряного і субстратного міцелію залежить від поживного середовища, на якому вирощували продуцента (табл. 1.1) [25].

При глибинному культивуванні стрептоміцетів спостерігається утворення щільних міцеліальних структур – пелетів, а також міцеліальних згустків, які обумовлюють диференціацію повітряного міцелію і процес біосинтезу вторинних метаболітів (Рис. 1.4) [29,30].

Таблиця 1.1. Залежність пігментації міцелію *S. albus* 2435/М від поживного середовища [25]

Поживне середовище	Міцелій:	Колір міцелія
Агар Чапека	Повітряний	Безбарвний
	Субстратний	Безбарвний
Вівсяний агар	Повітряний	Білий
	Субстратний	Безбарвний
Мінеральний агар Гаузе	Повітряний	Білий
	Субстратний	Безбарвний
Органічний агар Гаузе	Повітряний	Біло-кремовий
	Субстратний	Безбарвний
Глюкозоаспарагіновий агар	Повітряний	Сіро-жовтий
	Субстратний	Безбарвний

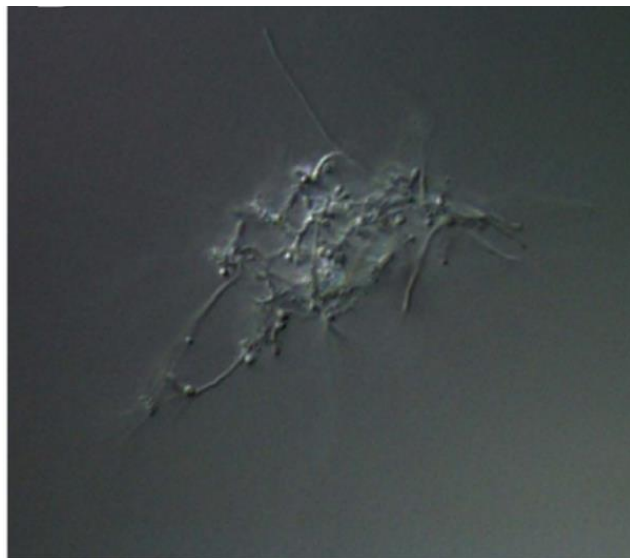


Рисунок 1.4. Згустки міцелію *S. albus* після вирощування в поживному середовищі NMMP [31].

#### 1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

За типом дихання *S. albus* відносять до суворих аеробів, тобто мікроорганізмів, яким для повноцінної життєдіяльності необхідно мінімум

20% кисню. За способом отримання енергії продуцент належить до хемоорганотрофів, які отримують енергію шляхом окислення або зброджування органічного субстрату. Крім того, для нормального розвитку продуцент потребує неорганічне джерело азоту та не потребує вітамінів і факторів росту.

В основі метаболізму і, відповідно, росту біомаси *S. albus* 2435/М лежить процес зброджування джерел вуглеводів, що включають в себе моно-, оліго-, та полісахариди, а також спирти, з яких оптимальними для вирощування і підтримки культури є глюкоза, фруктоза, ксилоза і манітол. Детальні результати наведені в табл. 1.2 [25].

Таблиця 1.2. Залежність росту *S.albus* 2435/М від джерела вуглецевого живлення [25].

Джерело вуглецю	Ріст <i>S.albus</i>
Глюкоза	+
Цукроза	±
Фруктоза	+
Арабіноза	±
Ксилоза	+
Рамноза	±
Рафіноза	±
Інозитол	±
Манітол	+

± - швидкість росту незначна; + - швидкість росту оптимальна

В промисловості *S. albus* 2435/М найчастіше вирощують і підтримують на типових агарних поживних середовищах для стрептоміцетів, що включають агар Чапека, вівсяний агар, мінеральний агар Гаузе, органічний агар Гаузе і глюкозо-аспарагіновий агар [23]. В ході лабораторних

досліджень та біосинтезу біомаси з метою отримання цільового продукту застосовують поживні середовища наступного складу [9], (г/дм<sup>3</sup>):

- для підтримки культури (середовище Гаузе 2):

глюкоза – 10,0; м'ясна вода – 60 см<sup>3</sup> (або бульйон Хотингера 30 см<sup>3</sup>); NaCl – 0,5; пептон – 5,0; агар-агар – 20,0;

- для розмноження культури:

глюкоза – 20,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 0,5; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,5; NaNO<sub>3</sub> – 3,0; NaCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,01; CaCO<sub>3</sub> – 3,0; бульйон Хотингера 20 см<sup>3</sup> на дм<sup>3</sup>; рН 6,8 – 7,8;

- для вирощування посівного матеріалу:

глюкоза – 0,006; соєве борошно дезодороване – 8,0; NaCl – 14,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 2,0; CaCl<sub>2</sub> – 4,5; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 5,8; MnCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O – 0,04; пропінол Б-400 – 0,014 дм<sup>3</sup>; рН 7,8 – 8,2;

- для виробничого біосинтезу:

соєве борошно – 8,0; крохмаль картопляний гідролізований – 10,0; NaCl – 14,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 2,0; MgCl<sub>2</sub> – 2,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,0; MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O – 0,04; пропінол Б-400; рН 7,8 – 8,2.

Оскільки метою даної роботи є отримання іммобілізованого косметичного препарату, основним компонентом якого є комплекс літичних ферментів, отриманий мікробним синтезом, важливо визначити вплив складу поживного середовища та співвідношення його окремих компонентів а також оптимальні технологічні параметри культивування на біосинтетичну активність продуцента для отримання максимальної кількості цільового продукту.

Як і більшість видів *Streptomyces*, *S. albus* 2435/М є мезофілом і росте при температурі 10–37 °С, з оптимальним значенням 28±1 °С [9]. Діапазон рН складає 6,5–8,0 [27].

Оскільки характерною ознакою продуцента є його здатність продукувати ряд гідролітичних ферментів, що включають глікозидази, літичні

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

ендопептидази, мурамідази, протеази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектру мікробних культур, було також встановлено стимулюючий вплив інших компонентів поживного середовища на біосинтетичну активність продуцента [9]. Аналіз літературних джерел показав, що максимальна продуктивність культури щодо синтезу ферментів різної специфічності проявляється на середовищі на основі меляси. Меляса має складний і не постійний хімічний склад, до якого входять азотисті сполуки, переважно амід, вуглеводи, зола (мінеральні речовини) та мікроелементи. Як мінеральні речовини в мелясі містяться  $K_2O$ ,  $MgO$ ,  $CaO$ . За такого складу культура отримує збалансоване харчування по всіх необхідних компонентах та ростові речовини. Використання меляси в складі поживного середовища призводить до збільшення виходу біомаси продуцента в 1,5–2 рази (Рис. 1.5). При цьому спостерігається підвищення в 2 і більше разів літичної активності культуральної рідини [32].

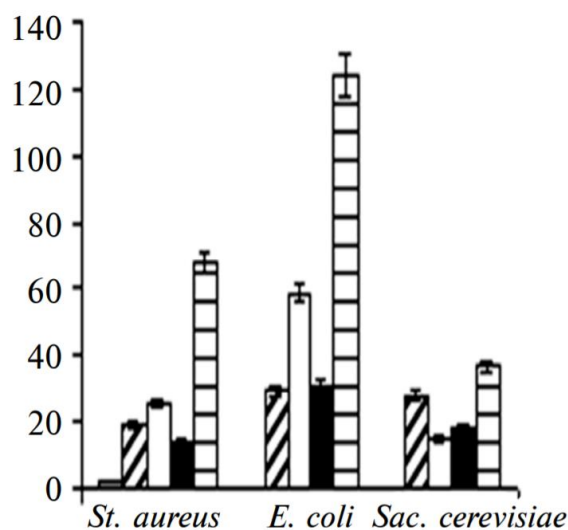


Рисунок 1.5. Рівень біосинтезу *S.albus* 2435/М літичного ферментного комплексу на поживних середовищах: ■ – молочна сироватка, ▨ – ріпакове борошно, □ – соєве борошно (контрольне), ▤ – горохове борошно, ▤ – меляса [32].

Використання сорбенту аеросилу А-300 в кількості 0,0001 г/дм<sup>3</sup> позитивно впливає на вихід цільового продукту. Потенційно це пов'язано з іммобілізаційною дією даного сорбенту. Збільшений вміст таких

мінеральних компонентів, як  $\text{MnCl}_2$  і  $\text{CaCl}_2$ , та зменшена кількість  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  також збільшував інтенсивність біосинтезу цільового продукту [33].

Отже, проаналізувавши вплив зовнішніх факторів на процес біосинтезу продуцентом вторинних метаболітів, для розробки цільового продукту на основі комплексу гідролітичних ферментів *S. albus* 2435/М було обрано два типи поживного середовища, для отримання посівного матеріалу і процесу біосинтезу відповідно.

Отримання посівного матеріалу буде відбуватися з використанням оптимізованого поживного середовища на основі глюкози в якості джерела карбону та соєвого борошна як джерела азотистих сполук, з додаванням аеросилу А-300 для підвищення біосинтетичної активності продуцента.

Склад оптимізованого поживного середовища для вирощування посівного матеріалу *S. albus* 2435/М, г/дм<sup>3</sup>: глюкоза – 5,0; соєве борошно – 15,0;  $\text{NaCl}$  – 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4$  – 5,0;  $\text{MnCl}_2$  – 0,008;  $\text{CaCl}_2$  – 6,0; аеросил – 1,0.

Для етапу промислового біосинтезу продуцента було обране поживне середовище на основі меляси. Це пов'язано зі зниженням вартості середовища для культивування, причому кінцевий вихід продукту та літична і протеолітична активність вторинних метаболітів залишається оптимальною.

Склад оптимізованого поживного середовища для виробничого біосинтезу *S. albus* 2435/М, г/дм<sup>3</sup>: меляса – 20,0; соєве борошно – 7,0;  $\text{NaCl}$  – 14,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4$  – 5,8;  $\text{MnCl}_2$  – 0,004; вода водопровідна –  $\leq 1,0$ .

## 1.6. Поширення в природі

Стрептоміцетів відносять до надзвичайно розповсюдженої в світі групи мікроорганізмів. Представники даного роду широко поширені в ґрунті, воді та інших природних середовищах і їх наявність їх в екосистемі визначається численними фізичними, хімічними та біологічними факторами, а саме харчовим стресом, температурою, рН, вологістю, солоністю, структурою ґрунту та клімату [16].

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

За рахунок сухого і лужного середовища в землі, стрептоміцети є численною мікробною популяцією в ґрунті (40% від всіх мікроорганізмів) і в результаті їх волокнистої форми, вони викликають міцність текстури ґрунту і захищають її від вітру та дощового викорінення [27]. Досліджуваний мікробний продуцент *S. albus* був вперше виділений саме з суглинистих ґрунтів Дніпропетровської області [13]. За типом живлення *S. albus* 2435/М відносять до сапрофітних мікроорганізмів, які в ході розвитку перетравлюють залишки рослин і тварин. Причому даний процес супроводжується виділенням специфічної речовини – сесквітерпеноїду геосміну, який надає характерного запаху ґрунту.

Окрім вищезазначених екологічних ніш деякі представники стрептоміцетів можуть також займати і інші місця проживання, такі як сіно та інші органічні матеріали, морські водоймища, рослини і тварини [27].

Хоча більшість стрептоміцетів є ефективними колонізаторами ґрунтів ризосфери та ризоплану, вони також можуть бути ендofітами, що колонізують внутрішні тканини рослин- і тварин-господарів. Проведені дослідження свідчать про наявність асоціацій стрептоміцетів з комахами відрядів Перетинчастокрилих, Двокрилих, Лускокрилих і Жосткокрилих [34].

Хоча види *Streptomyces* традиційно вважаються ґрунтовими бактеріями, в останні десятиліття стала очевидною їх наявність і широке поширення в океанічних екосистемах, пов'язане з різноманітними морськими організмами. Попередні роботи в регіоні Північної Атлантики, Кантабрійському морі (Біскайській затоці), Північній Іспанії, виявили наявність великої кількості штамів *Streptomyces* у літоральних морських водоростях та глибоководних коралових рифів безхребетних у каньйоні Авілес [35].

Крім Землі та Світового океану, все більше свідчень про наявність штамів *Streptomyces* у атмосфері. Так, штами стрептоміцетів були виділені з води, що міститься в хмарах нижнього ярусу, в Пюї-де-Доме, Південна Франція та неодноразово виділялися від атмосферних опадів, таких як

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23



дошова вода, град та сніг у регіоні Кантабрії протягом 2013–2014 років. До таких мікроорганізмів відносяться три розповсюджені види: *S. albidoflavus*, *S. cyaneofuscatus* і *S. carnosus*, раніше виділені з наземних та океанічних середовищ [36].

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

### 2.1. Характеристика кінцевого продукту

В якості цільового кінцевого продукту в даній роботі виступає іммобілізований ензиміотик косметичного призначення. Ензиміотик, що продукується *S. albus* 2435/М, являє собою комплекс гідролітичних ферментів, що включають ензими літичної і протеолітичної дії, а саме глікозидази, літичні ендопептидази, мурамідаци, протеази та амілази, сумісна дія яких здатна руйнувати широкий спектр мікробних культур. Основним компонентом даного комплексу ферментів є протеїнази.

Згідно з Комітетом Номенклатури Міжнародного Союзу Біохімії і Молекулярної Біології, протеолітичні ферменти відносяться до 4 групи 3 підгрупи (гідролази) і утворюють підклас пептид-гідролаз, або протеїназ [37]. Протеїнази, що продукує *S. albus* 2435/М, відносять до ендопептидаз (КФ 3.4.21-25, КФ 3.4.99), тобто ферментів, що характеризуються переважно своєю дією на пептидні зв'язки у внутрішніх областях поліпептидного ланцюга, віддалених від його N і C кінців [38]. Вони розщеплюють пептидний зв'язок всередині пептидного ланцюга, «впізнають» та зв'язують короткі пептидні послідовності субстратів та відносно специфічно гідролізують зв'язки між певними амінокислотними залишками [39]. Як і більшість ендопептидаз, продукованих мікроорганізмами виду *S. albus*, фермент *S. albus* 2435/М відносять до серинових проїназ, за рахунок присутності в активному центрі функціональної групи амінокислоти серину.

Серинові протеази – білки, що складають третину від всіх відомих на даний час протеолітичних ферментів [40]. Характерною будовою серинових протеїназ є наявність складок, які утворюють два шестигранних  $\beta$ -бочонки подібної структури, шляхом несиметричного об'єднання, для розміщення на

					ДП 6213. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Рижкова Т.С.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	25	109
Керівник	Тодосічук Т.С.					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

їх поверхні залишків каталітичної тріади, що складається з амінокислотних залишків серину, гістидину та аспарагінової кислоти (Рис. 2.1) [41]. Первинна специфічність серинових протеаз зумовлена виключно залишками  $P_1$  (перша амінокислота від центру з N-кінця), а залишки в інших позиціях впливають на кінетичні параметри ферментативної реакції. Серинові протеази в основному активні при нейтральних та лужних значеннях рН, з оптимумом дії між 7,0 та 11,0. Молекулярна маса коливається від 15 до 35 кДа.

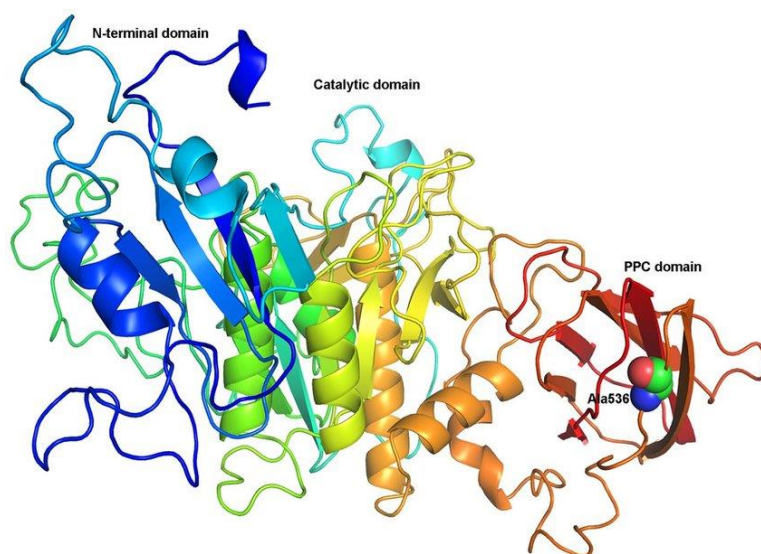


Рисунок 2.1. Структура серинових протеаз на прикладі протеази ArgA (N-terminal domain – N-кінцевий домен; PPC-domain – C-кінцевий домен бактеріальної препептидази; Catalytic domain – каталітичний домен (каталітична тріада)) [42].

Каталітичний механізм полягає в двоступеневій реакції гідролізу (ацилювання) і деацилювання), при якому проміжний продукт (фермент-субстратний комплекс) втрачає залишок амінокислоти або цілий пептидний фрагмент. Сериновий залишок в каталітичній тріаді є нуклеофілом у реакції протеолізу та ацилюється шляхом атаки на карбонільну групу гідролізуючого пептидного зв'язку. Донором протону для звільненої NH-групи є залишок гістидину. Утворення ковалентного зв'язку відбувається під час утворення негативно зарядженого інтермедіату. На стадії деацилювання (також шляхом формування перехідного тетраедрального інтермедіату) відбувається гідроліз

ацильної похідної серину, за участі молекули води з вивільненням пептиду і регенерації активного центру ферменту. Результатом цього є руйнування пептидних зв'язків як в клітинній стінці, так і пептидних зв'язків інших білків (Рис. 2.2) [39].

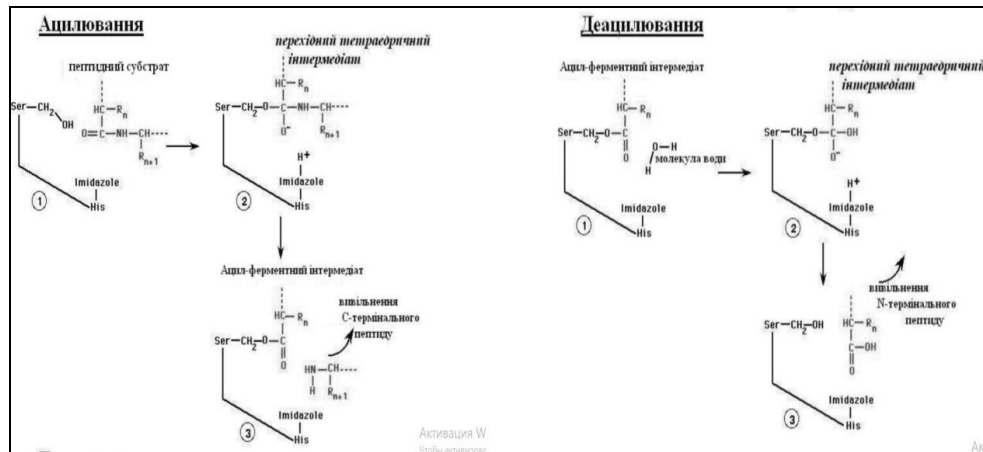


Рисунок 2.2. Механізм дії серинових протеїназ [39].

## 2.2. Схема хімічних перетворень

Оскільки цільовим продуктом виступає комплекс літичних і протеолітичних ферментів продуцента *S. albus* 2435/М, схема їх хімічних перетворень в процесі біосинтезу аналогічна стандартному шляху синтезу білкових речовин для даного мікроорганізму.

Першим етапом синтезу цільового продукту є перетворення джерел карбону і нітрогену, які надходять до організму продуцента в ході культивування. Для обраного продуцента основним джерелом сполук вуглеводів, що використовується в складі поживного середовища при отриманні посівного матеріалу виступає глюкоза, а при виробничому біосинтезі – меляса – побічна продукція бурякоцукрового виробництва, основним компонентом якої є сахароза [43]. Джерелом нітрогену в обох випадках є культивування є соєве борошно.

В основі метаболізму глюкози, сахарози та інших цукрів меляси, як і будь-яких вуглеводів, лежать стандартні механізми перетворення, такі як цикл Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз) та цикл Кребса (Рис. 2.3) [44].

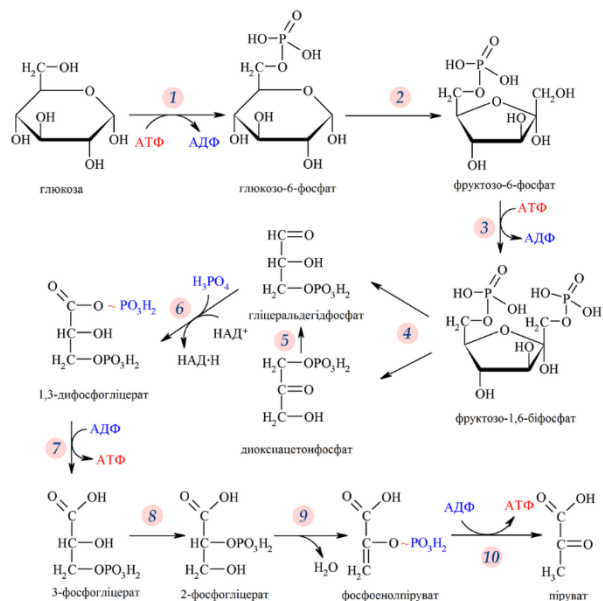


Рисунок 2.3. Катаболізм вуглеводів меляси і глюкози в процесі культивування *S. albus* 2435/М за циклом Ембдена-Мейергофа-Парнаса [45].

Попереднім етапом перетворення вуглеводів є розщеплення цукрів меляси спочатку до моносахаридів  $\alpha$ -глюкози і  $\beta$ -фруктози, які, в свою чергу, в ході гліколізу перетворюються на піруват.

Утворений в результаті гліколізу піруват в ході циклу трикарбонових кислот перетворюється на щавлевооцтову кислоту, яка перетворюється на амінокислоту аспарагінову кислоту (Рис. 2.4).

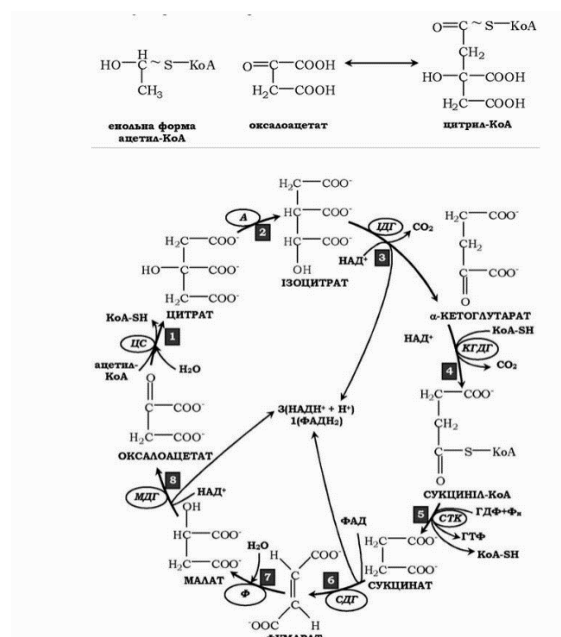


Рисунок 2.4. Наступний етап катаболізму глюкози, вуглеводів меляси в процесі культивування *S. albus* 2435/М за циклом Кребса.

Шляхи синтезу інших амінокислот, які входять до складу білкової молекули показано на рис. 2.5 [44].

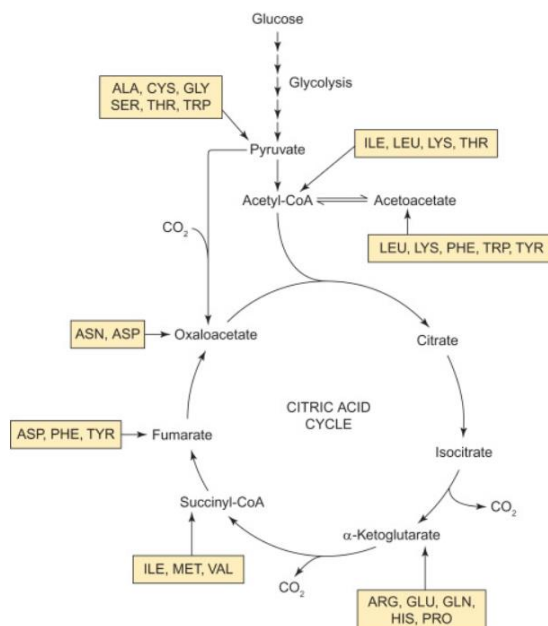


Рисунок 2.5. Катаболізм азотистих сполук, що містяться в соєвому борошні в ході культивування *S. albus* 2435/М з утворенням основних амінокислот, що входять до складу білкових молекул [44].

Наступним етапом хімічних перетворень є процес біосинтезу цільових молекул ферментів, який складається з чотирьох стадій:

#### 1. Активація амінокислоти.

Відбувається за участі ферменту аміноацил-тРНК-синтетази, яка утворює за участі іонів магнію фермент-субстратний комплекс з амінокислотою і АТФ, які взаємодіють один з одним з утворенням проміжної сполуки аміноациладенілату і пірофосфату.



#### 2. Зв'язування аміноациладенілату з тРНК.

На другому етапі, який каталізується тим самим ферментом аміноацил-тРНК-синтетазою, аміноацильний залишок переноситься з аміноациладенілату на відповідну тРНК, що призводить до вивільнення АМФ і утворення молекули аміноацил-тРНК. Цей продукт реакції аміноацил-тРНК – є елементом вторинного генетичного коду й містить як

інформаційну компоненту, так і енергію у вигляді високоенергетичного складноефірного зв'язку. Даний процес відбувається в цитоплазмі, результатом його є утворення активованої амінокислоти, що здатна до подальших перетворень.



### 3. Синтез поліпептидних ланцюгів

Синтез поліпептидних ланцюгів відбувається в процесів трансляції, елонгації та термінації. Молекула іРНК рухається між двома субодинамицями рибосом, і до неї послідовно приєднуються молекули тРНК з амінокислотами. При цьому за принципом комплементарності кодони іРНК вступають у зв'язок з антикодонами тРНК. Послідовність розташування амінокислот при цьому визначається порядком чергування триплетів у молекулі іРНК. Про завершення синтезу поліпептидного ланцюга сигналізує термінуючий кодон іРНК (УАА, УАГ, УГА).

### 4. Утворення вторинної і третинної структур білкової молекули.

Здійснюється в цитоплазмі шляхом скручування, згортання поліпептидного ланцюга.

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.

Біотехнологічним препаратом, який отримують в результаті реалізації технології є субстанція іммобілізованого ензибіотику для виробництва косметичних засобів. Ензибіотик являє собою комплекс гідролітичних ферментів, що є вторинними метаболітами продуцента *S. albus* 2435/М.

Якісний та кількісний склад кінцевого продукту виробництва, %: діюча речовина (комплекс гідролітичних ферментів, з літичною та протеолітичною активністю) – 80; носій для іммобілізації діючої речовини (цеоліт) – 15; домішки (залишки компонентів ПС NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, соєвого борошна, меляси, вторинних метаболітів) – 5.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Ступінь очистки кінцевого продукту залежить від вмісту в ньому діючої речовини. Відповідно, для даного біотехнологічного препарату ступінь очистки складає 80%.

Кінцевий продукт застосовується в якості компонентів косметичних засобів, що представлені різноманітними доглядовими засобами для осіб старше 18 років для зовнішнього використання, такими як креми, лосьйони, ензимні пудри, пілінги та ін. [46]. Відповідно до законодавства України косметичні засоби даного типу відносять до нестерильних, оскільки в готовій продукції може міститися до 1000 мезофільних аеробних і факультативних анаеробних мікроорганізмів на г або см<sup>3</sup> продукції [47]. Отже готова субстанція для виробництва косметичної продукції може містити сторонню мікробіоту.

#### 2.4. Методи очистки цільового продукту

Цільовий продукт – комплекс ферментів літичної і протеолітичної активності – виділяється після проведення біосинтезу продуцентом *S. albus* 2435/М з культуральної рідини, що містить як діючу речовину, так і залишки вторинних метаболітів з компонентами ПС, такими як солі, залишки джерел карбону і нітрогену. Оскільки цільовий продукт є діючим компонентом іммобілізованого косметичного препарату, методом його очистки ферменту його іммобілізація на твердому носії.

Іммобілізація – це процес, при якому ферменти закріплюються на твердих носіях або в них, створюючи гетерогенну іммобілізовану ферментну систему. Іммобілізована форма ферментів імітує їх природний режим у живих клітинах, де більшість із них приєднана до клітинних структур цитоскелету, мембрани та органели. Перевагою такої форми є більша стійкість ферментів до змін навколишнього середовища, можливість забезпечення багаторазового повторного використання ферментів, постійної роботи ферментативних процесів, швидке припинення реакцій та більшої різноманітності конструкцій біореакторів [48]. Обмеження іммобілізованих

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31



ферментів полягають в витратах виробництва на сам носій і можливості забруднення таким ферментом навколишнього середовища. Крім того, важливим недоліком іммобілізації є те, що кінетика нативних ферментів, таких як амілази або протеази, різко знижується при іммобілізації за рахунок обмежень, що виникають в результаті дифузії [49].

Ферменти можуть бути іммобілізовані різними методами, які в основному можуть бути класифіковані як фізичні, де існують слабкі взаємодії між підтримкою та ферментом, і хімічні, де між опорою та ферментом утворюються ковалентні зв'язки [50].

Перевагами хімічної іммобілізації є утворення більш міцних ковалентних зв'язків, що призводить до надійнішого закріплення і високої міцності кон'югату, а також менший шанс забруднення продуктів реакції. Також, використання даних методів дозволяє модифікувати ферменти і впливати на їх властивості, такі як субстратна специфічність і каталітична активність. Суттєвими недоліками цих методів є інактивація ферменту або необхідність попередньої активації ферменту для реагування його з відповідними функціональними групами молекули ферменту (Рис. 2.6).

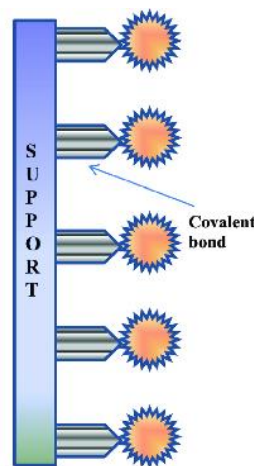


Рисунок 2.6 Схема хімічної іммобілізації фермента (Support – носій; Covalent bond – ковалентний зв'язок) [50].

Фізичні методи іммобілізації (адсорбційні і механічні) полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Для них характерні більш слабкі взаємодії, такі як водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, сили

Ван-дер-Ваальса, іонне зв'язування ферменту з матеріалом, що слугує носієм, або механічне утримання ферменту в середовищі [51]. При адсорбційній іммобілізації фермент утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних, водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При механічному способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, мікрокапсули, волокна, мембрани та ін. (Рис. 2.7) [9].

Перевагами фізичної адсорбції та механічної іммобілізації є економічна вигода такої технології, за рахунок можливості регенерації і перезавантаження носія новим ферментом. Недоліками використання такого методу іммобілізації є можливість розриву зв'язку між ферментом та носієм в результаті недостатньої сили зв'язку між ними [51].

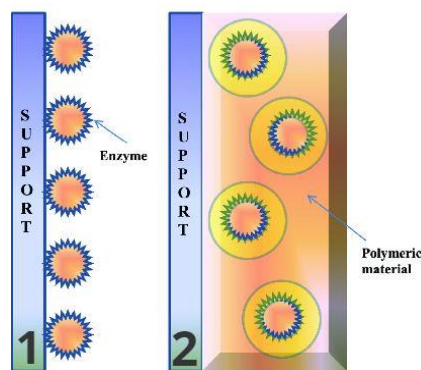


Рисунок 2.7. Методи фізичної іммобілізації: 1-адсорбційна; 2 – механічна; (Enzyme – фермент; Support – носій; Polymeric material – полімерний матеріал) [50].

Для виробництва іммобілізованої субстанції для косметичного препарату, основним діючим компонентом якого є комплекс гідролітичних ферментів, *S. albus* 2435/М, був обраний фізичний метод іммобілізації, а саме адсорбція на носії. Дана технологія дозволяє забезпечити відсутність екранування та зв'язування активного центру ферменту, що часто трапляється при використанні хімічних та інших методів [52]. Крім того вона є досить простою і вигідною комерційно завдяки низькій вартості необхідних компонентів та збереженню високої активності ферментів .

Важливим етапом в процесі проведення очистки ферменту шляхом фізичної адсорбції є обрання носія, в якості якого може застосовуватися широкий спектр доступних речовин. Критерії вибору носія, який підходить для даного ферменту та цільового продукту, включають: вартість, доступність, стабільність (або реакційну здатність, якщо це необхідно) в конкретних умовах. Фізико-хімічні параметри носія, які слід враховувати: площа поверхні, розмір частинок, структура пор та тип функціональних груп, присутніх на поверхні. Загальна класифікація типових носіїв, використовуваних для адсорбції ферменту, представлена на рис. 2.8 [53].

На сьогоднішній день поширеними носіями для вторинних метаболітів, що продукують різні штами *S. albus* є поліетиленгліколь (ПЕГ) та аеросил. Це було визначено в ході дослідження під час якого визначали ефективність іммобілізації бактеріолітичного комплексу *S. albus* UN44 адсорбційним способом з використанням наступних носіїв: аеросил марки А-300 (А), метилцелюлозу (МЦ) та гідрофільні полімери – поліетиленгліколь, поліоксиетилен (ПОЕ). Було визначено, що з усіх обраних зразків поліетиленгліколь та аеросил можна віднести до носіїв, що мають стабільний вплив на досліджуваний ферментний препарат та призводять до зберігання його активності [9].

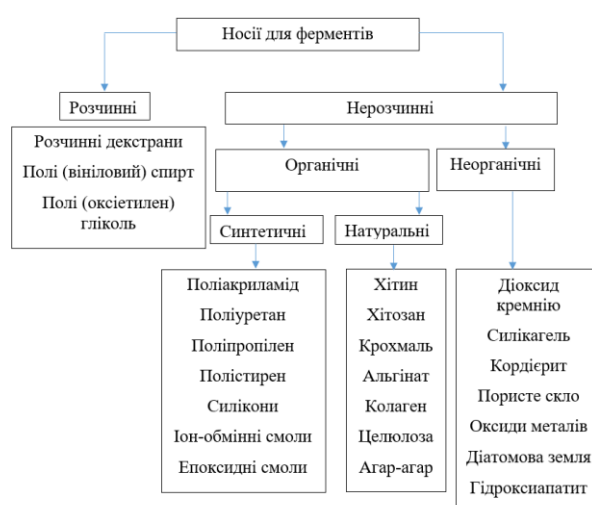


Рисунок 2.8. Класифікація носіїв для іммобілізації ферментів [53].

Поліетиленгліколь – полімер етиленгліколю, що зазвичай використовується як носій твердих дисперсних систем у різних рецептурах косметичних та фармацевтичних засобів. Перевагами ПЕГ як носія є низька температура плавлення, швидкий час твердіння, невисока вартість та токсичність. Крім того, оскільки багато типів ПЕГ гідрофільні, вони часто використовуються як компоненти для підсилення проникнення косметичного засобу в шкіру, особливо у дерматологічних препаратах місцевої дії [54]. Однак він також має деякі обмеження, такі як невисока здатність тривалий час зберігати аморфну форму препарату [55].

Аеросил являє собою непористий високодисперсний кремнезем, основними адсорбційними центрами якого є силанольні групи  $\text{SiOH}$ . Перевагами носія є високі адсорбційні властивостями по відношенню до білків, ферментів, екзо- і ендотоксинів, мікроорганізмів, що забезпечуються відсутністю пор, а також нетоксичність [56]. В косметичній промисловості аеросил використовується як ефективний гель-засіб, який може підвищити в'язкість масел, воску та емульсій. Він також полегшує обробку пігментів і запобігає осідання твердих компонентів в суспензії.

Не дивлячись на беззаперечні переваги носіїв, зазначених вище, останнім часом значного поширення набуло використання в якості носія для іммобілізованих ензимів цеолітів – природних кристалічних, гідратованих алюмосилікатів лужних і лужноземельних катіонів (Рис. 2.9) [57]. Серед різних альтернативних сполук для іммобілізації цеоліти демонструють велику перспективу як носії, завдяки збільшенню площі поверхні, регульованими гідрофільним та гідрофобним властивостям за рахунок контролю співвідношення  $\text{Si/Al}$ , а також їх теплової та механічної стійкості [58]. Таким чином можна отримати більшу стабільність і підвищену активність ферменту. Ці матеріали стійкі до забруднення сторонньою мікробіотою та дії радіоактивного випромінювання. Слід зазначити економічну вигідність використання даного носія та його нетоксичність по відношенню до організму споживача, що дозволяє застосовувати його у

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

складі фармацевтичних і косметичних засобів, що можуть контактувати зі слизовими оболонками і проникати безпосередньо в організм [59]. Іншою перевагами цеолітів є висока площа поверхні, висока стійкість при перепадах температури та рН. Ця властивість дозволяє застосовувати їх в якості носіїв в різних середовищах, навіть за нестабільних умов.

Окрім використання в якості носіїв для ферментів, цеоліти також набули поширення в якості компонентів косметичної продукції, особливо засобів особистої гігієни. Ці продукти включають зубні пасти, креми для обличчя, лікувальні креми, очищаючі креми, косметичні лосьйони, тощо [60]. У цих продуктах цеоліти функціонують як абразивні засоби, в'язучі засоби, носії і компоненти для видалення запаху. Відповідно, використовуючи цеоліт в якості носія можна забезпечити не тільки іммобілізацію гідролітичного ферментного комплексу та збереження його каталітичних властивостей, а й надання необхідної структури і консистенції готовому косметичному препарату, не застосовуючи сторонні речовини, що позитивно позначиться на вартості готового цільового продукту та дозволить запобігти потенційного забруднення сторонніми компонентами, включаючи як механічні частки, так і потенційно патогенну мікробіоту.

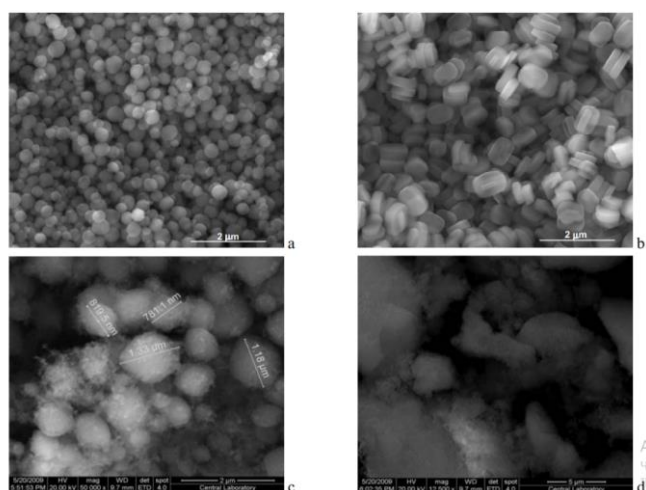


Рисунок 2.9. Мікрофотографії деяких видів цеолітів (а – Сілікаліт-1; б - Сілікаліт-2; с - Н+Beta 300; d - Н+Beta 150) [61].

Особливістю проведення іммобілізації цільового ферментного комплексу є те, що на відміну від типових технологій отримання ензимних

препаратів, які полягають в іммобілізації вже обробленого і очищеного стабільного ферменту, в даному випадку іммобілізація відбувається безпосередньо з культуральної рідини, яка містить не тільки саму діючу речовину, а й сторонні компоненти ПС. Така технологія є не новою, і вже застосовувалася при виробництві препарату для очищення ґрунту від нафти та нафтопродуктів на основі ензимного комплексу продуцентів *Rhodotorula glutinis* Y-1114, *R. glutinis* Y-1113 і *Rhodococcus eqvi* B-1 115, оскільки використання фугату забезпечувало кращу стійкість препарату до умов навколишнього середовища [62].

Причиною обрання даної технології для ензимного комплексу *S. albus* 2435/М є більша ефективність іммобілізації діючої речовини з фугату культуральної рідини у порівнянні з іммобілізацією з розчину готового ферменту. Потенційно це може бути пов'язано з тим, що при використанні вже очищеного ферментного комплексу сторонні компоненти культуральної рідини, такі як залишкові компоненти поживного середовища і вторинні метаболіти зв'язуються з адсорбентом, перешкоджаючи таким чином іммобілізації самого цільового продукту. Перевагами такого способу іммобілізації є можливість суміщення одразу декількох етапів виробництва (виділення, концентрування, іммобілізація), що позитивно позначається на простоті технології і економічності виробництва [9]. Таким чином, проведення адсорбційної іммобілізації в даному випадку має забезпечити не лише виділення максимально можливої кількості ферментного комплексу з культуральної рідини, а також отримання готової стабільної форми препарату без додаткових процесів очистки і виділення. Отже, носій, який обирають для іммобілізації має бути пристосованим до використання в середовищі з нестабільним хімічним складом, рН і температурою, не втрачаючи при цьому своїх адсорбційних властивостей.

Саме тому в якості способу очистки цільового продукту був обраний метод адсорбційної іммобілізації на носії, в ролі якого виступає цеолітове борошно ПАТ «Закарпатнерудпром», призначене для використання в якості

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

мінерального наповнювача. Це дозволить отримати готовий продукт необхідного ступеня очистки, структури і консистенції, з оптимальною стабільною каталітичною активністю ензиміотику і з можливістю проведення іммобілізації безпосередньо з фугату культуральної рідини зі збереженням всіх необхідних властивостей як носія, так і самого ферментного комплексу.

## 2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Цільовим продуктом запропонованої технології є іммобілізований гідролітичний ферментний препарат (ензиміотик) для використання у складі функціональної косметики. Властивості препарату – антимікробна (антисептична) дія та регенерація шкіри обумовлена активністю літичних ферментів та цеоліту, як носія.

Антимікробна дія цільового продукту полягає в руйнуванні ферментним комплексом міжпептидних зв'язків білків клітинної стінки мікроорганізмів, забезпечуючи тим самим деградацію цілої клітини, не викликаючи при цьому потенційного розвитку механізмів резистентності у мікроорганізмів. Ферментний склад цільового продукту, що окрім серинових протеїназ включає амілази, глікозидази, літичні ендопептидази та мурамидази, здатний руйнувати міжпептидні зв'язки в різних місцях клітинної стінки мікроорганізмів, що призводить до загибелі бактеріальної клітини (Рис. 2.10) [63]. Це надає готовому цільовому продукту можливість протидіяти розмноженню і розвитку широкому спектру як грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів, що включають представників наступних родів: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida* і *Lactobacillus* [64].

Регенерація шкіри при використанні косметичного засобу на основі кінцевого продукту виробництва обумовлена здатністю ферментного комплексу розщеплювати не лише білки клітинної стінки мікроорганізмів, а також білки, що знаходять на поверхні шкірних покривів. Крім того, серинові протеази, які є основною складовою ферментного комплексу продуцента,

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

здатні руйнувати специфічні клітини, що виробляються базальними шарами шкіри і забезпечують її товщину і поверхневу структуру – кератиноцити [65]. Використання в якості носія для іммобілізації ензимного комплексу цеоліту покращує вищезазначений ефект, що пов'язано з його ексфоліюючими і пілінгуючими властивостями, які сприяють кращому видаленню верхніх загрубілих ділянок шкіри. В результаті, утворені білкові фрагменти і залишки клітин краще змиваються засобами для очистки шкіри, тим самим забезпечуючи її гладкість, блиск і регенерацію, за рахунок індукції диференціації молодих клітин.

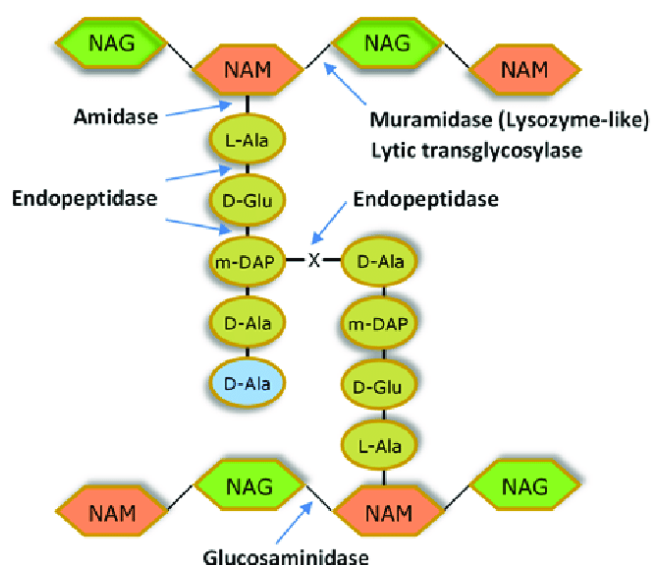


Рисунок 2.10. Мішені дії ферментів гідролітичного комплексу *S.albus* 2435/М в клітинній стінці мікроорганізмів. (NAG – N-ацетилглюкозамін; NAM – N-ацетилмурамова кислота; m-DAP – мезодіамінопімелінова кислота) [63].



## РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

### 3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Особливістю геному *S. albus* є його найменший розмір з усіх представників роду *Streptomyces*, який складає 6,841,649 пар основ. Крім того, ретельний аналіз хромосомних генів показав тенденцію *S. albus* до зменшення кількості ортологічних груп генів та збільшення вмісту пар гуанін-цитозин (73,3%). Основні особливості одиночної хромосоми наведені в табл. 3.1. На відміну від інших геномів стрептоміцетів, одинична хромосома включає сім оперонів рРНК (16S-23S-5S) та 66 генів тРНК (41 вид). Наявність семи оперонів рРНК може пояснити надзвичайно швидкі темпи зростання та універсальність цього виду в якості промислових продуцентів вторинних метаболітів [66].

Таблиця 3.1 Основні характеристики хромосоми *S.albus* [67]

Властивість	Значення
Топологія	Лінійна
Загальний розмір	6 841 649
Термінальні інвертовані повтори	2 × 30 000 пар основ
Вміст Г-Ц пар	73,3%
Кодуюча послідовність	5832
Середня довжина гену	1011 пар основ
Кодуюча щільність	86.8%
Рибосомальні РНК	7 × (16S–23S–5S)
Транспортні РНК	66 генів (41 вид)

Промисловим продуцентом цільового продукту є представник стрептоміцетів *S. albus* 2435/М. Проте оскільки геном даного мікроорганізму

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив	Рижкова Т.С.						
Консульт.							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	40	109
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

не є повністю секвенованим на сьогоднішній день, в даному розділі розглядається типовий представник групи – *S. albus* J1074.

Хромосома *S. albus* J1074 містить 5832 передбачуваних послідовностей, що кодують білки. З цих послідовностей 4665 (80%) кодують білки з визначеними функціями, тоді як решта 1172 (20%) були позначені як гени, що кодують гіпотетичні білки. Точка початку реплікації (оріджин) є ідеально симетричною і розташована посередині хромосоми на відстані 580 пар основ зліва від центру, в діапазоні 3 419 111–3 420 244 пар основ – ця область містить 19 тандемних послідовностей DnaA, подібних до коробки, і є оточеною генами *dnaA* та *dnaN*. Центральне «ядро», яке містить гени, що формують основні ознаки організму, містить майже всю хромосому приблизно від 0,3 Мб до 6,4 Мб. Відповідно, геномна топологія *S. albus* є досить мінімальною порівняно з іншими секвенсованими геномами актиноміцетів [70].

В додатку А наведена генетична карта *S. albus* J1074 [68]. На ній показан загальний розмір геному *S. albus* J1074 і наведене взаємне розташування генів, що відповідають за синтез наступних білків:

- Гістидин кіназа (Histidine Kinase) і регулятор відповіді (Response regulator).

Ферменти гістидин кінази (ГК) являють собою родину сигнальних трансмембранних трансфераз, які автофосфорилують гістидиновий залишок [69]. Разом з регуляторами відповіді ГК утворюють двокомпонентну сигнальну систему, яка є основним механізмом стрептоміцетів для регуляції метаболізму.

Принцип роботи двокомпонентної сигнальної системи полягає в наступному: мембранно-зв'язана ГК сприймає специфічні стимули навколишнього середовища і передає їх на регулятор відповіді, який опосередковує клітинну відповідь, головним чином завдяки транскрипційній регуляції генів-мішеней [70].

- Фосфотрансферазний білок

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

Це компонент фосфотрансферазної системи транспорту вуглеводів, яка каталізує транспорт і фосфорилування численних моносахаридів, дизахаридів, аміно-цукрів, поліолів та інших похідних цукру [71].

Як і в більшості стрептоміцетів, гени, що відповідають за біосинтез вторинних метаболітів *S. albus*, розташовані у вигляді кластерів, які відповідають за вироблення різних типів метаболітів, що включають ряд антибіотичних речовин і ферментів [72]. Використання різноманітних технік селекції дозволило активізувати дані кластери і сприяло отриманню нових штамів *S. albus*, включаючи і *S. albus* 2435/M.

Експресія генів, що відповідають за шляхи отримання вторинних метаболіту *S. albus* знаходиться під контролем щільних і складних ієрархічних регуляторних мереж, які інтегрують безліч сигналів, що сприймаються плейотропними та/або кластерно розташованими транскрипційними регуляторами [73]. Незважаючи на те, що рефакторинг та генна інженерія транскрипційних регуляторів, виявилися продуктивним підходом для активації окремих генних кластерів, потреба у генерації ортогональних наборів промоторів та репресорних сайтів може бути трудомісткою і складною [74].

З іншого боку, плейотропні регулятори можуть бути орієнтовані на оптимізацію експресії природних продуктів (табл. 3.2). Наприклад, показано, що регулятор фосфофруктокіназа (pfk) пов'язує первинний та вторинний метаболізми. Інші плейотропічні ДНК-зв'язуючі регулятори, такі як рецепторний білок cAMP (CRP), можуть розпізнавати генетично споріднені сайти зв'язування в декількох кластерах генів у відповідь на ще не визначені сигнали, або, як у випадку з DasR, можуть модулювати свою зв'язуючу активність у відповідь на глікозильовані цукри. Додаткові глобальні регулятори можуть викликати активацію вторинного метаболізму у відповідь на нестачу поживних речовин та обмеження вмісту фосфатів [75].

Таблиця 3.2

Глобальні регулятори *Streptomyces* [75]

Глобальний регулятор	Роль	Вплив на вторинний метаболізм
<i>DasR</i>	Регулятор експресії генів вторинних метаболітів у відповідь на фосфорильовані аміно-цукри	Негативний
<i>AtrA</i>	Транскрипційний активатор актинорходіна; антагоніст <i>DasR</i>	Позитивний
<i>Pfk*</i>	Фосфофруктокіназа; ключовий фермент гліколізу, який контролює метаболічні шляхи, що впливають на вторинний метаболізм	Негативний
<i>KbpA-AfsKRS</i>	Каскад генів, що зв'язує фосфати та процеси вторинного метаболізму	Позитивний
<i>PhoR-PhoP</i>	Двокомпонентна система, що регулює засвоєння фосфатів; перекривається регулятором <i>AfsKRS</i>	Негативний
<i>CRP*</i>	Рецептор cAMP-білка; активізує транскрипцію біосинтетичних генів та контролює вироблення попередників; частково розділений регулон з регулятором <i>AfsKRS</i> та <i>PhoRP</i>	Позитивний
<i>BldA</i>	Кодує тРНК для рідкого лейцинового кодону ТТА, виявленого в багатьох регуляторах, специфічних для шляху вторинного метаболіту	Позитивний

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуцента.

Промисловим продуцентом цільового продукту є ґрунтовий актиноміцет *S. albus* 2435/М. Шляхом аналізу літератури було виявлено, що на сьогоднішній день єдиним способом отримання даного штаму є використання індукованого мутагенезу [76].

Для проведення індукованого мутагенезу в якості хімічного мутагену використовували N-метил-N-нітрозометилсечовину (МНС). МНС належить до алкілувальних мутагенів, тобто речовин, що впливають на основи, здійснюючи переніс алкілувальної групи на реакційноздатний атом кисню або азоту, змінюючи тим самим комплементарні здатності основ [77]. Вибір даного мутагену був обумовлений попереднім досвідом його використання при роботі з мікроорганізмами з метою підвищення рівня біосинтетичної

активності [78]. Крім того, аналіз літератури показав ефективність використання МНС при селекції саме представників стрептоміцетів інших видів [79,80]. Наприклад, даний мутаген вже активно використовувався для отримання промислового продуценту *S. sioyaensis* з підвищеним рівнем продукування антибіотичних речовин [81].

При проведенні хімічного індукованого мутагенезу з використанням МНС відбувався за наступною методикою: по 1 мл суспензії п'ятиденних спор природнього штаму *S. albus* 2435 у дистильованій воді переносили в центрифужні пробірки "Eppendorf" і центрифугували для осадження спор протягом 10 хв при 12 тис. об/хв. Спори ресуспендували в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера (ФБ) (рН 6,0) з МНС (30 мкг/мл). Інкубація проходила протягом двох годин в термоміксері.

Для зупинки дії МНС спори продуцента центрифугували на швидкості 12000 об./хв протягом 10 хв. Відмивали від мутагену спори в 0,05М ФБ (рН=7,0) і знову центрифугували в тих самих умовах. Відмивання проводили двічі [82]. Отриману суспензію культивували на чашках. Отриманий мутантний штам аналізували за біосинтетичною активністю, а також за здатністю продукувати бактеріолітичний ферментний комплекс.

Для визначення біосинтетичної активності надсинтетика *S. albus* 2435/М використовували розрахунок параметра індексу літичної активності (ІЛА), тобто відношення діаметра зони лізису досліджуваної культури до діаметра всієї колонії. Для визначення ІЛА окремі колонії були пересіяні на чашки Петрі з середовищем наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): NaCl – 6,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 0,5; FeSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> – кожен по 0,01; агар-агар – 25, рН=7,0 яке містило як єдине джерело вуглецю суспензію тесткультури (*S. aureus* або *E. coli*) та вирощували при 28±1°C впродовж 5–7 діб [76]. Бактеріолітичну активність окремих клонів оцінювали за здатністю лізувати тест-культуру і характеризували ІЛА.

Для визначення здатності отриманого продуцента синтезувати бактеріолітичний ферментний комплекс *S. albus* 2435/М культивували при

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

28±1°C протягом 5 днів при перемішуванні 220 хв<sup>-1</sup> в рідкому поживному середовищі наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): глюкоза – 6,0; соєве борошно – 8,0; NaCl – 14,0; CaCl<sub>2</sub> – 4,5; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 5,8; MnCl<sub>2</sub> – 0,04; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,5; H<sub>2</sub>O – до 1 л. Літичну активність вимірювали турбідиметричним методом [32]. Отримані результати наведені в табл. 3.3.

Оцінка здатності отриманого мутантного штаму продукувати комплекс бактеріолітичних ензимів показала збільшення на 150% у порівнянні з природним штамом (*S. albus* 2435). Цей показник є дещо менший, у порівнянні з результатами, отриманими в 1998 році, коли біосинтетична активність вперше отриманого мутантного штаму перевищувала активність природного у 2 – 2,5 рази. Часткове зменшення даної ознаки було викликано гетерогенністю культури та природною і індукованою мінливістю штаму [9]. Збільшення літичної активності комплексу, очевидно, можна пояснити зміною спрямованості біосинтетичної здатності *S. albus* у бік підвищення процентного вмісту N-ацетилмурамідози – ферменту, що руйнує В-1-4-глікозидний зв'язок у муреїні клітинної стінки мікроорганізмів та відіграє важливу роль в процесі лізису клітини. Крім того, дія N-ацетилмурамідози забезпечує умови для прояву активності інших компонентів комплексу, таких як пептидази і протеїнази [82].

Таблиця 3.3 Характеристика ІЛА для *S. albus* 2435/М [76]

Характеристика	<i>S. albus</i> 2435/М
	<i>S. aureus</i> / <i>E. coli</i>
Середнє значення ІЛА, одиниці	3,1/4,1
«+»-варіанти, %	5,2/3,3
«-»-варіанти, %	0/0,8
Коефіцієнт варіабельності, %	18,7/13,5

### 3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

В результаті проведення аналізу літератури і виявлення методу отримання використовуваного в роботі промислового продуцента *S. albus* 2435/М була розроблена схема його отримання, що передбачає використання методу індукованого мутагенезу. В якості мутагену виступає хімічна сполука МНС.

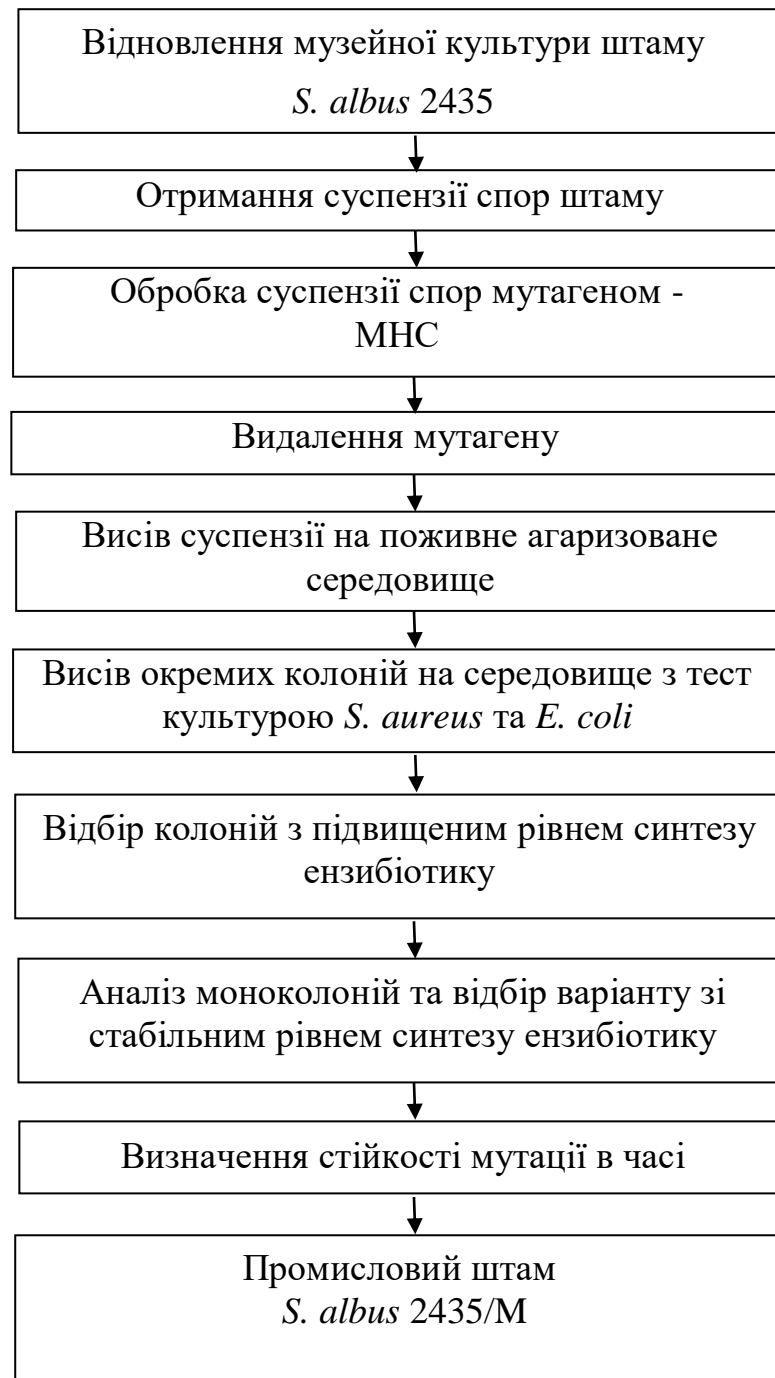


Рисунок 3.3. Загальна схема отримання продуцента *S. albus* 2435/М.

## РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевою продукцією виробництва, що розробляється, є іммобілізований ензибіотик косметичного призначення, основною діючою речовиною якого є комплекс гідролітичних ензимів з провідною протеолітичною та літичною активністю, що складає 30 тис. МО/г [9].

Основним діючим нормативно-технічним документом, що передбачає опис технології отримання кінцевого продукту є регламент на виробництво іммобілізованого ферментного препарату Циторецифен-М (ПР 20.59-02070987-001:2015) [83]. Даний документ визначає основні етапи і умови проведення виробництва іммобілізованого ензибіотику.

Призначенням цільового продукту є використання в якості субстанції для виробництва функціональних косметичних засобів, що включають порошко- і гелеподібні засоби для догляду за шкірою. Основні функції цільової продукту в косметичній продукції – антисептична і ексfolіююча.

Кінцевий продукт виробництва являє собою порошок, що складається з окремих часток діаметром 1-2 мм. Цільова продукція виробництва пакується в пакети з поліетиленової плівки за ГОСТ 10354-82 по 0,5 кг [84]. Розфасована продукція пакується в ящики з гофрованого картону за ГОСТ 9142-2014 [85].

Кожна пакувальна одиниця готової продукції має містити етикетку, що має бути чіткою, однозначною, а її зміст має відповідати затвердженій виробником формі. Етикетки мають містити наступну інформацію [86]:

- Номер серії;
- Товарний знак;
- Дата виготовлення;

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Рижкова Т.С.						
Консульт.							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	47	109
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		



- Термін придатності;
- Номер технічних умов;
- Номер реєстраційного посвідчення;
- Умови зберігання;
- Якісний та кількісний склад продукції;
- Активність препарату;
- Ступінь очистки;

Транспортування кінцевої продукції має здійснюватися таким чином, щоб [87]:

- не була втрачена можливість її ідентифікації;
- вона не були контаміновані іншими лікарськими засобами або речовинами і самі не контамінували їх;
- були вжиті відповідні застережні заходи для запобігання ушкодженням (розливання, розсипання, бій) і крадіжкам;
- продукція була захищена і не зазнавали надмірного впливу таких чинників, як висока або низька температура, світло, волога та інших негативних впливів, а також не ушкоджувалися мікроорганізмами або паразитами (шкідливими комахами і тваринами);

Зовнішня упаковка має забезпечувати належний захист від впливу всіх зовнішніх факторів, а також мати чітке маркування, що не видаляється.

Подібно до аналогічних ферментних препаратів на основі протеаз кінцевий продукт зберігається при температурі від -25 °C до +20 °C в сухому, захищеному від потрапляння прямих сонячних променів місці. Термін зберігання – 12 місяців [9].

#### 4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Характеристика основної, допоміжної сировини, матеріалів і напівпродуктів подана у вигляді табл. 4.1.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що застосовуються при отримання іммобілізованого ензиму

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітки
1			
1. Основна сировина			
1.1. Аеросил	ГОСТ 14922-77 Аэросил. Технические условия [88].	Зовнішній вигляд: Неущільнений: рихлий голубовато-білий порошок; Ущільнений: біла маса у вигляді рихлих шмочків; Масова частка двоокису кремнію (SiO <sub>2</sub> ) в перерахунку на прокалену речовину, %, не більше: 99,9;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ.
1.2. Гідроортофосфат калію	ГОСТ 2493-75. Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный [89].	Масова частка 3-водного двозаміщеного фосфорнокислого калію (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O), %, не менше ніж: 99; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше ніж: 0,005;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ та виробничого біосинтезу.
1.3. Глюкоза	ДСТУ 4464:2005. Глюкоза кристалічна гідратна [90].	Кольоровість розчину, одиниць оптичної густини, не більше: 0,02; Масова частка вологи, %, не більше ніж: 9;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ.
1.4. Меляса	ДСТУ 3696-98 (ГОСТ 30561-98). Меляса бурякова. Те	Органолептичні показники: Зовнішній вигляд:	Для використання в якості компонента ПС

	хнічні умови [91].	густа в'язка непрозора рідина; Колір: від коричневого до темно-бурого; Запах: властивий буряковоцукровій мелясі без стороннього запаху; Масова частка сухих речовин, %, не менше: 75,0;	для виробничого біосинтезу.
1.5. Натрій хлорид	ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия (с Изменениями N 1, 2) [92].	Масова частка хлористого натрію (NaCl) в прокаленому препараті, %, не менше: 99,9; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше: 0,003;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ та виробничого біосинтезу.
1.6. Соєве борошно	ДСТУ 4543:2006. Борошно соєве харчове [93].	Масова частка вологи та летких речовин, %, не більше: 9,0; Масова частка жиру, %, на сухі речовини не більше: 15,0; Масова частка сирого протеїну, %, на сухі речовини не менше: 40,0; Масова частка загальної золи, %, не більше: 7,0;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ та виробничого біосинтезу.
1.7. Сульфат магнію	ГОСТ 4523-77. Государственный стандарт. Магний серно-кислый 7-водный. Технические условия [94].	Масова частка 7-водного сірчанокислого магнію ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), %, не менше: 99,5; Кислотність ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), %, не більше: 0,002; Лужність ( $\text{MgO}$ ), %, не більше: 0,002;	Для використання в якості компонента ПС для виробничого біосинтезу.

		не більше: 0,001;	
1.8. Хлорид кальцію	ГОСТ 450-77 Кальций хлористый технический. Технические условия [95].	Зовнішній вигляд: порошок або гранули білого кольору; Масова доля хлористого кальцію, в перерахунку на %, не більше: 96,5;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ.
1.9. Хлорид марганцю (II)	ГОСТ 612-75 Реактивы. Марганец (II) хлористый 4-водный. Технические условия (с Изменением N 1) [96].	Масова частка 7-водного сірчаноокислого магнію ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), %, не менше: 99,0; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше: 0,003;	Для використання в якості компонента ПС для отримання ПМ та виробничого біосинтезу.
1.10. Цеоліт	ТУ У 08.-1-00292540-001: 2014 «Щебінь, пісок та борошно з природного цеоліту Сокирницького родовища» [97].	Фракції борошна: 0 – 0,014 мм; Механічна міцність по стиранню: 4,0%; По подрібненню: 0,5%; Сторонні домішки органічного походження: відсутні;	Для використання в якості носія для адсорбційної іммобілізації ензиміотику.
2. Допоміжна сировина			
2.1. Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питьевая. Требования и методы контролирования качества [98].	Вміст хімічних домішок, біологічні показники, рН згідно ДСТУ	Для подачі в рубашку ферментера; для приготування миючих і дезінфікуючих розчинів; для приготування ПС для отримання ПМ і виробничого біосинтезу.
2.2. Засіб дезінфекцій	Методичні вказівки щодо застосування	Зовнішній вигляд: прозора рідина від	Для обробки невеликого за

ний «Мікробак ® форте»	засобу Мікробак ® форте (Mikrobac® forte) з метою дезінфекції [99]	жовтуватого до слабо-рожевого кольору з незначним характерним запахом; Густина при 20°C: 1,006 – 1,014 г/см <sup>3</sup> ;	розміром обладнання і інструментарію.
2.3. Засіб рідкий миючий «Гросс- Клін»	Інструкція по застосуванню засобу рідкого миючого «Гросс- Клін» [100]	Зовнішній вигляд: однорідна прозора або опалесцююча рідина; Колір: від прозорого до коричневого; рН: 12,5±1;	Для миття невеликого за розміром обладнання і інструментарію.
2.3. Засіб рідкий миючий «Цитадель. Ейсид.»	Інструкція по застосуванню засобу рідкого миючого «Цитадель-Ейсид» [100]	Зовнішній вигляд: однорідна прозора або опалесцююча рідина; Колір: від прозорого до коричневого; рН: 2,0±1;	Для миття поверхонь, стін, підлоги лабораторних і виробничих приміщень, а також для миття ємкісного обладнання.
2.3. Натрій гідроксид	ГОСТ 4328-77. Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия [101].	Масова доля NaOH, %, не менше: 99; Масова доля Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , %, не більше: 0,8;	Для обробки внутрішньої частини ферментера та ємкістних збірників.
2.4. Перекис водню	ГОСТ 177-88 Водорода перекись. Технические условия (с Изменением N 1, с Поправкой) [102].	Зовнішній вигляд: прозора рідина; Масова доля перекису водню: 30 – 40%.	Для обробки робочих поверхонь в лабораторії.
2.5. Фенол	ГОСТ 23519-93. Фенол синтетический технический [103].	Зовнішній вигляд: біла кристалічна речовина; Температура кристалізації, °C, не нижче 40,7. Масова доля нелетучого залишку, %, не більше: 0,001.	Для обробки лабораторного обладнання.

3. Матеріали			
3.1. Картон гофрований	ГОСТ 9142-2014 Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия (с Поправками) [85].	Допустиме відхилення від внутрішніх (контрольованих) розмірів ящиків не перевищує 2 мм; Відстань між скобами: не більше ніж 45 мм;	Для використання в якості вторинної упаковки цільового продукту.
3.2. Поліетиленова плівка	ГОСТ 10354-82 Пленка полиэтиленовая. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3, 4, 5) [84].	Міцність при розтягуванні в повздовжньому напрямі: не менше 16,1 кгс/см <sup>2</sup> ; В поперечному: не менше 16,1 кгс/см <sup>2</sup> ;	Для використання в якості первинної упаковки цільового продукту.
3.3 Скловолокно	ГОСТ 8325-2015 Стекловолокно. Нити крученые комплексные. Технические условия [104].	Волокна не горючі, не запалюються, не токсичні. Відсутність брудних масляних плям, ворсу, петель, потовщень.	Для очистки повітря на головному фільтрі.
3.4 Фільтр-сітка повітряна	ГОСТ 2715-75. Сетки металлические проволочные [105].	Відстань між проволочками основи – до 3 мм. Діаметр проволочки основи - до 0,7 мм.	Для попередньої очистки повітря від механічних контамінантів розміром до 5 мкм.

#### 4.3 Опис технологічного процесу

Технологія виробництва іммобілізованого ензимиотику, продуцентом якого є актиноміцет *S. albus* 2435/М включає 12 стадій, що включають стадії допоміжних робіт, основного технологічного процесу, пакування і маркування продукту, а також переробки і знешкодження відходів [9].

## ДР1. Санітарна підготовка виробництва

### ДР1.1. Приготування миючих і дезінфікуючих розчинів.

#### ДР1.1.1 Приготування миючих розчинів

Для попередньої обробки лабораторних, виробничих приміщень, а також обладнання і комунікацій на основі миючих засобів зі складу готують миючі розчини, які надходять до ДР1.3.1, 1.3.2, 1.4.1.

Миючі розчини готують на основі наступних миючих засобів:

- Для обробки стін, підлоги, поверхонь лабораторних і виробничих приміщень, а також для миття великого ємкісного обладнання: 0,1-3% розчин засобу рідкого миючого «Цитадель. Ейсид.»;
- Для обробки невеликого лабораторного обладнання застосовують готовий засіб рідкий миючий «Гросс-Клін», який не потребує розведення.

#### ДР1.1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів

Дезінфікуючі розчини для санітарної підготовки виробництва готують на основі наступних хімічних речовин:

- Для обробки невеликого обладнання та інструментарію – 0,25% розчин дезінфекційного засобу «Мікробак ® форте (діючі речовини: бензил-С12- 18-алкілдиметиламоній хлорид – 18,6–21,2%; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 4,5–5,5%);
- Для обробки робочих поверхонь в лабораторних приміщеннях – 6% розчин перекису водню;
- Для обробки лабораторного обладнання – 3–5% розчин фенолу;
- Для обробки великих ємкісних апаратів (ферментер і збірники для приготування поживних середовищ і обробки культуральної рідини) – розчин каустичної соди (40%);

Готові дезінфікуючі розчини надходять до ДР1.3.1, 1.3.2, 1.4.1.

## ДР1.2. Підготовка персоналу

### ДР1.2.1 Медичне обстеження персоналу

При влаштуванні на роботу, а також два рази на рік в процесі роботи кожен співробітник підприємства проходить санітарно-медичний огляд. Виробник відповідає за наявність інструкцій, відповідно до яких забезпечується його інформування про такий стан здоров'я співробітників, який може вплинути на якість продукції.

### ДР1.2.2 Навчання персоналу

Навчання персоналу забезпечується керівником підприємства для технічного, обслуговуючого персоналу і персоналу, що здійснює прибирання. Воно включає в себе загальні правила перебування у виробничих зонах, зонах зберігання і контрольних лабораторіях. Крім того, кожен працівник має пройти навчання відповідно до закріплених за ним обов'язків, з періодичною перевіркою і оцінкою його знань і умінь.

### ДР1.2.3 Підготовка персоналу до роботи

Підготовка персоналу до роботи включає переодягання в чистий і придатний до роботи спецодяг, що відповідає виконуваним ним операціям. Відкриті частини тіла, такі як руки, обробляються спеціальними засобами, що знаходяться в допоміжних зонах, які не сполучаються безпосередньо з виробничими або складськими зонами [106].

## ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

### ДР1.3.1 Підготовка лабораторій

Підготовка лабораторних приміщень полягає в митті і обробці дезінфікуючими та миючими розчинами з ДР1.1.1, 1.1.2 робочих поверхонь, стін і підлоги. Відпрацьовані миючі і дезінфікуючі розчини надходять на утилізацію в ЗВ12.

### ДР1.3.2 Підготовка цехів

Підготовка цехів, де здійснюється безпосередньо технологічний процес отримання кінцевого продукту полягає в митті і обробці дезінфікуючими



розчинами з ДР1.1.1, 1.1.2 робочих поверхонь, стін і підлоги. Відпрацьовані розчини надходять на утилізацію в ЗВ12.

#### ДР 1.4. Підготовка обладнання і комунікацій

##### ДР1.4.1 Мийка обладнання та комунікацій

Мийка обладнання здійснюється спочатку впродовж двох хвилин гарячою водою, потім в залежності від його розміру обробляється або 0,1–3% розчином миючого засобу «Цитадель.Ейсид» (для великого обладнання) або миючим засобом «Гросс-Клін» (для лабораторного обладнання, а також невеликого виробничого).

Після миття обладнання проходить обробку або 40% розчином каустичної соди (для ферментерів та збірників), або ж 0,25% розчином дезінфекційного засобу «Мікробак ® форте» та фенолом (для лабораторного обладнання, і невеликих апаратів виробничого цеху) . Відходи направляють до ЗВ12. Оброблене обладнання та комунікації промивають питною водою до нейтрального значення рН.

##### ДР1.4.2 Перевірка на герметичність

Перевірка на герметичність здійснюється спочатку візуально, оглядаючи складові частини апаратів – штуцера, ущільнення, вентилі, фланцеві з'єднання. Далі апарати герметично закривають і подають в апарат протягом 30 хвилин надлишковий тиск 0,15–0,2 МПа. В разі утворення бульбашок – апарат є негерметичним.

##### ДР1.4.3 Стерилізація обладнання та комунікацій

Стерилізація обладнання і комунікацій здійснюється термічним способом шляхом подачі перегрітої насиченої водяної пари під тиском 0,2 МПа всередину апарату протягом 90 хвилин при температурі 140°C. Відпрацьований теплоагент подають на знешкодження в ЗВ12.

#### ДР2. Підготовка стерильного повітря

##### ДР2.1 Забір повітря з атмосфери

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітрязабірника висотою 8–10м. Труба розташовується в місцях з

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

мінімальною запиленістю та загазованістю. Паралельно проводиться очистка повітря від крупних механічних часток, таких як гілки, листя та ін. Температура повітря складає 20 °С, вологість в межах 60-90%.

#### ДР2.2. Механічна очистка повітря

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів має своєю метою видалення аерозольних механічних часток та попередження абразивного пошкодження компресійної апаратури. Для виконання цієї операції атмосферне повітря подається в фільтр попередньої очистки, який дозволяє видалити частки розміром більше 5 мкм шляхом інерційного осадження. Таке очищення дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частково мікроорганізмів.

Для проведення даної операції використовують фільтр неперервної дії коміркового типу, що очищає повітря запиленістю до 5 мг/м<sup>3</sup>, пилоємністю 200 г/м<sup>2</sup>, та ефективністю очистки 75%. Відпрацьований фільтрувальний матеріал надходить на регенерацію до ПВ11, відділені контамінанти – до ЗВ12.

#### ДР2.3. Стабілізація термодинамічних показників

Для стабілізації термодинамічних показників, що включають тиск, вологу, і температуру, очищене від механічних домішок повітря направляється в повітряний компресор, де відбувається стиснення його до надлишкового тиску 0,34 МПа. Стиснуте повітря надходить в ресивер для охолодження його до необхідної температури 28 °С.

#### ДР2.4. Очистка повітря на головному фільтрі

Для відділення 98% механічних і мікробіологічних контамінантів простерилізоване і стиснуте повітря надходить в головний фільтр об'ємом 5 м<sup>3</sup> глибинного типу з сорочкою. Фільтруючий матеріал – скловата з діаметром волокна 7–21 мкм, діаметр пор – 21 мкм.

Після обробки повітря відпрацьовані фільтрувальні матеріали надходять до ПВ11, а контамінанти – до ЗВ12.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

## ДР2.5. Стерилізація повітря на індивідуальному фільтрі

Остаточна стерилізація повітря відбувається на індивідуальних фільтрах тонкої очистки, призначених для стерилізації аераційного технологічного повітря перед подачею в апарати, де відбувається аеробне культивування продуценту (інокулятор для вирощування посівного матеріалу і ферментер). Ефективність очистки складає 99,9%.

## ДР3. Підготовка поживних середовищ

### ДР3.1 Підготовка ПС для вирощування посівного матеріалу

#### ДР3.1.1 Приготування та гомогенізація композиції ПС

Розчини сольових компонентів, вуглецевий (глюкоза) і азотний (соєве борошно) субстрати подаються об'ємно-ваговим дозатором в реактор-змішувач для гомогенізації і отримання поживного середовища для культивування посівного матеріалу продуцента.. Компоненти ПС для вирощування посівного матеріалу подаються в наступному порядку: хлорид мангану, сульфат магнію, ортофосфат калію, хлорид натрію, хлорид калію, аеросил, глюкоза, соєве борошно.

Гомогенізація поживного середовища відбувається при температурі 70 °С протягом 30 хвилин, швидкість перемішування – 1 об/с. Перемішування здійснюється лопатевою мішалкою, яку приводить в дію електродвигун з редуктором 20 кВт. Підтримка температурний режим забезпечується наявністю сорочки, куди подається пароводяна суміш.

#### ДР3.1.2 Стерилізація ПС

Стерилізація ПС з ДР3.1.1 здійснюється в реакторі-змішувачі термічним способом з використанням гострої пари. Параметри стерилізації:  $t = 125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,1\text{ МПа}$ ,  $\tau = 30\text{ хв}$ . Стерилізація розчину глюкози відбувається окремо, у більш м'якому режимі:  $t = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,08\text{ МПа}$ ,  $\tau = 8\text{ хв}$ . Простерилізоване ПС подається на операцію ДР4.3.

## ДР3.2 Підготовка ПС для виробничого біосинтезу

### ДР3.2.1 Приготування розчину меляси

Зі збірників на складі меляси подається ваговим дозатором в реактор-змішувач, об'ємом 630 л для приготування розчину концентрацією 40%. Гомогенізація меляси з водою забезпечується лопатевою мішалкою, швидкість перемішування становить 1 об/с.

### ДР3.2.2 Приготування і гомогенізація композиції ПС

До реактора-змішувача об'ємом 630 літрів об'ємно ваговим дозатором подаються компоненти ПС для виробничого біосинтезу в наступній послідовності: сульфат магнію, ортофосфат калію, хлорид натрію, хлорид мангану, соєве борошно, меляси. Розчин готується при температурі 70°C протягом 30 хвилин. Перемішування і гомогенізація композиції забезпечується лопатевою мішалкою, швидкість перемішування – 1 об/с.

### ДР3.2.1 Стерилізація ПС

Стерилізація поживного середовища для проведення промислового біосинтезу проходить в реакторі-змішувачі шляхом подачі гострої пари. Параметри стерилізації:  $t = 125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,1\text{ МПа}$ ,  $\tau = 30\text{хв}$ . Підготовлене і простерилізоване ПС подається до ферментера для проведення виробничого біосинтезу.

## ДР4. Підготовка посівного матеріалу

### ДР4.1 Відновлення музейної культури

Відновлення вихідної спорової культури продуцента *S. albus* 2435/М, що зберігається та підтримується на агаризованому ПС Гаузе, проводять пересівом на свіже агаризоване середовище в пробірках та вирощуванням протягом 7 діб при  $t = 28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### ДР4.2 Вирощування посівного матеріалу на колбах

З відновленої на ДР4.1. культури готують суспензію, яка пересівається на рідке середовище Чапека в качалочних колбах Ерленмейера для рідкофазного культивування, об'ємом 750 см<sup>3</sup>, в якій відбувається

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

нарощування посівного матеріалу на качалках (швидкість перемішування 220–240 об/хв) протягом 48 годин при температурі  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### ДР4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Отриманий посівний матеріал в колбах вносять в інокулятор з підготовленим і простерилізованим ПС з ДР 3.1.2 та культивують в наступному режимі: температурі  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , перемішування 300 об/хв, аерація  $0,4V_{\text{повітря}}/1V \times \text{хв}$  середовища протягом 48 годин. Подача інокуляту здійснюється через верхній порт, поживного середовища – через верхні бокові стінки. Перемішування культуральної рідини здійснюється регульованою турбінною мішалкою, швидкість руху якої регулюється верхнім приводом з одинарним торцевим ущільненням та двигуном постійного струму. Аерація забезпечується автоматичною подачею простерилізованого повітря з ДР2.5, що перед надходженням в інокулятор проходить очистку через фільтр тонкої очистки.

Отриманий посівний матеріал, який має бути обов'язково мікробіологічний чистий, активністю не менше 2000 МО/г подається на стадію виробничого біосинтезу [9].

#### ТП5. Виробничий біосинтез

Отриманий на попередній стадії посівний матеріал перекачується в виробничий ферментер, де знаходиться підготоване і простерилізоване ПС з ДР3.2.3.

Виробничий біосинтез продуцента відбувається в ферментері об'ємом 2000л з контролем наступних параметрів:  $t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 60\text{--}72$  год,  $\text{pH} = 6,8\text{--}7,2$ . Тиск у ферментері становить 0,05 МПа, швидкість перемішування – 300 об/хв аерація –  $0,4 V_{\text{повітря}}/1V \times \text{хв}$ . Перемішування культуральної рідини забезпечується застосуванням турбінної мішалки, яка регулюється верхнім приводом з одинарним торцевим ущільненням та двигуном постійного струму. Аерація забезпечується автоматичною подачею простерилізованого повітря з ДР2.5, що перед надходженням в інокулятор проходить останній етап стерилізації через фільтр тонкої очистки.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

Результатом проведення виробничого біосинтезу є отримання культуральної рідини, фугат якої містить комплекс літичних і протеолітичних ферментів, активність яких складає 5000 МО/г [23].

По завершенню процесу культивування продуцента в рубашку ферментера подається холодна вода (7–10 °С) для охолодження культуральної рідин перед наступними стадіями обробки.

#### **ТП6. Відділення біомаси**

Охолоджена культуральна рідина перекачується насосом в фільтруючу центрифугу. Розділення рідкої і твердої фази відбувається за швидкості  $n = 1000$  об/хв, відділену тверду фазу, що представляє собою біомасу клітин продуцента відправляють до ЗВ12 на знешкодження, а фугат, що містить цільовий продукт, подається на стадію іммобілізації.

#### **ТП7. Адсорбційна іммобілізація ензиміотику**

##### **ТП7.1 Внесення носія**

В реактор з перемішуючим пристроєм вносять фугат культуральної рідини. Після чого, при перемішуванні, завантажують носій для проведення адсорбційної іммобілізації ензиміотику – цеолітове борошно. Кількість носія складає 5% від об'єму культурального фугату.

##### **ТП7.2 Перемішування та витримка суміші**

Процес іммобілізації відбувається при  $t = 28 \pm 2^\circ\text{C}$ , протягом 30–50 хв. Результатом є отримання іммобілізованого на носії ензиміотику.

#### **ТП8. Відділення іммобілізованого ензиміотику**

Іммобілізований на цеоліті цільовий продукт подається з реактора в центрифугу для виділення кінцевого продукту з фугату. Процес відділення відбувається за наступних умов:  $\tau = 30$  хв,  $n = 6000$  об/хв. Відділений фугат накопичується в збірнику, після чого надходить на знешкодження на стадію ЗВ12. Іммобілізований ензиміотик надходить на стадію сушіння.

#### **ТП9. Сушіння препарату**

Суспензію відділеного іммобілізованого ензиміотику з попередньої стадії подають в розпилювальну сушарку для висушування. В процесі

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

сушіння суспензія розпорошується, а потім надходить в сушильну камеру, де контактує з сушильним агентом в ролі виступає гаряче повітря. Висихаючи, продукт під дією сили тяжіння опускається на дно циклону, де він збирається і безперервно виводиться із зони сушіння через розвантажувальний циклон. Параметри сушіння:  $t_{\text{вх}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{к}} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 10\text{--}30\text{ с}$ ,  $w = 5\%$ . Результатом є отримання висушеного кінцевого іммобілізованого ензібіотику мікробіологічного походження, активністю 30 тис. МО/г [9].

### **ПМВ10. Фасування, пакування**

#### **ПМВ10.1 Фасування препарату в пакети**

Отриманий на ТП9 висушений порошок кінцевого продукту вологістю 5% фасують в поліетиленові пакети по 0,5 кг. Пристрій для фасування оснащений двопоточним ваговим дозатором, який самостійно формує трьохшовні пакети з поліетиленової стрічки і засипає в нього дозовану порцію порошку; пакет запаюється, відрізається і покроково транспортується приймальним транспортером.

#### **ПМВ10.2 Пакування пакетів у коробки**

Запаяні поліетиленові пакети з кінцевим продуктом фасуються в картонні коробки по 12 штук і відправляються на склад для зберігання.

### **ПВ11. Переробка відходів і викидів**

На дану стадію поступають змінні повітряні фільтри, що входять до складу фільтрів попередньої очистки з ДР2.2, головного фільтру з ДР2.4 та фільтрів тонкої очистки з ДР2.5.

### **ЗВ12. Знешкодження відходів і викидів**

На дану стадію поступають і транспортуються на подальшу утилізацію:

- Відпрацьовані розчини для миття і дезінфекції виробничих приміщень, обладнання і комунікацій з ДР 1.3.1, 1.3.2, 1.4.1;
- Відпрацьоване повітря з ТП5;
- Відпрацьований теплоагент з ДР 1.4.3, 1.3.2;
- Відпрацьоване поживне середовище з ДР4 і ТП5;

- Біомаса продуцента з ТП6;
- Фугат з ТП8.

#### 4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва іммобілізованого ензиміотику розрахований на виробничу серію, що складається з 6 кг цільового ензиміотику, розфасованого в 12 поліетиленових пакетів по 0,5 кг. Основні показники виробництва представлені у табл. 4.2.

Таблиця 4.2 Матеріальний баланс виробництва іммобілізованого ензиміотику

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ТП5	Посівний матеріал			120	ТП5	Культуральна рідина			1330
	Поживне середовище			1280		Втрати з виносом повітря (5%)			70
	Всього:	1400				Всього:	1400		
ТП6	Культуральна рідина			1330	ТП6	Біомаса	46		
						Фугат			1218
						Втрати (5%)			66
	Всього:	1330				Всього:	1330		
ТП7	Фугат			1218	ТП7	Розчин іммобілізованого ензибіотику			1253
	Цеоліт			61		Втрати (2%)			26
	Всього:	1279				Всього:	1279		
ТП8	Розчин іммобілізованого ензибіотику			1253	ТП8	Іммобілізований ензибіотик			122,3
						Фугат			1067,7



						Втрати (5%)			63
	Всього:	1253				Всього:	1253		
ТП9	Імобілізова ний ензибіотик			122, 3	ТП9	Сухий порошок імобілізова ного ензибіотику	6, 1		
						Конденсат			109, 7
						Втрати (5%)			6,5
	Всього:	122,3				Всього:	122,3		
ПМВ 10	Сухий порошок імобілізова ного ензибіотику	6,1			ПМВ 10	Запакований сухий імобілізова ний ензибіотик, в тому числі: пакети порошок коробки	6	12 2	
	Поліетилено ві пакети		12			Втрати (1,5%)	0,1		
	Картонні коробки		2						
	Всього:	20,1				Всього:	20,1		

#### 4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.3 Перелік контрольних точок, що забезпечують відповідність  
готової продукції вимогам НТД

Номер стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичн ість перевірки	Нормативн а характерис тика показника
ДР1.1.1 Приготування миючих розчинів Кх 1.1.1.1	Розчин миючого засобу «Цитадель.Ейс ид», Кількість	Об'ємно- ваговий дозатор	Кожну операцію	0,1-3 г/дм <sup>3</sup>

	миючого засобу «Цитадель.Ейс ид»			
ДР1.1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів Кх 1.1.2.1	Розчин NaOH, Кількість NaOH	Об'ємно-ваговий дозатор	Кожну операцію	40 г/дм <sup>3</sup>
	Розчин дезінфекційного засобу «Мікробак ® форте», Кількість розчину дезінфекційного засобу «Мікробак ® форте»	Об'ємно-ваговий дозатор	Кожну операцію	0,25 г/дм <sup>3</sup>
	Розчин перекису водню, Кількість перекису водню	Об'ємно-ваговий дозатор	Кожну операцію	6 г/дм <sup>3</sup>
	Розчин фенолу, Кількість фенолу	Об'ємно-ваговий дозатор	Кожну операцію	3–5 г/дм <sup>3</sup>
ДР1.3 Підготовка виробничих приміщень Км	Мікробіологічна чистота повітря	Седиментація	Кожну операцію	<200 КУО/м <sup>3</sup>
ДР1.4.2 Перевірка на герметичність Кт 1.4.2.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,15-0,2 МПа
ДР1.4.3 Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 1.4.3.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
	Температура	Термометр	Кожну операцію	140 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	90 хв
ДР2.3 Стабілізація термодинамічних	Температура	Термометр	Кожну операцію	28 °С
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,34 МПа

показників Кт 2.3.1			операцію	
ДР2.4 Очистка повітря на головному фільтрі Км 2.4.1	Мікробіологічна чистота повітря	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	<10 КУО/м <sup>3</sup>
ДР2.5 Стерилізація повітря на індивідуальному фільтрі Кт 2.4.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР3.1.1 Приготування та гомогенізація композиції ПС Кт 3.1.1.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	70 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Швидкість перемішування	Автоматич ний тахометр	Кожну операцію	1 об/с
ДР3.1.2 Стерилізація ПС Кт 3.1.2.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	125 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,1 МПа
ДР3.2.1 Приготування розчину м'яси Кх 3.2.1.1	Кількість м'яси	Ваговий дозатор	Кожну операцію	40 г/дм <sup>3</sup>
	Швидкість перемішування	Автоматич ний тахометр	Кожну операцію	1 об/с
ДР3.2.2 Приготування і гомогенізація композиції ПС Кт 3.2.2.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	70 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Швидкість перемішування	Автоматич ний тахометр	Кожну операцію	1 об/с
ДР3.2.3. Стерилізація ПС Кт 3.2.3.1	Температура	Автоматич ний регулятор температур и	Кожну операцію	125 °С
	Час	Годинник	Кожну	30 хв

			операцію	
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,1 МПа
ДР4.1 Відновлення музейної культури Кт 4.1.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	28±1°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	168 год
ДР4.1 Відновлення музейної культури Км 4.1.2	Мікробіологічна чистота	Візуально	Кожну операцію	Відповідність морфології культури, відсутність сторонньої мікробіоти
ДР4.2 Вирощування посівного матеріалу на колбах Кт 4.2.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	28±1°C
	Час	Годинник	Кожну операцію	48 год
	Швидкість перемішування	Тахометр	Кожну операцію	220-240 об/хв
ДР4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Кт 4.3.1	Витрати повітря	Ротаметр	Кожну операцію	0,4 Vповітря/1 V×хв
	Температура	Датчик температури, Контрольна панель	Кожну операцію	28±1°C
	Тиск	Автоматичний манометр, контрольна панель	Кожну операцію	0,05 МПа
	Час	Контрольна панель	Кожну операцію	48 год
	Швидкість перемішування	Автоматичний тахометр, контрольна панель	Кожну операцію	300 об/хв
	Активність посівного матеріалу	Турбідиметричний метод	Кожну операцію	2000 МО/см <sup>3</sup>

ТП5. Виробничий біосинтез Кт 5.1	Температура	Датчик температур и, Контрольна панель	Кожну операцію	28±2°C
	Тиск	Автоматичний манометр, контрольна панель	Кожну операцію	0,05 МПа
	Час	Годинник	Кожну операцію	60-72 год
	Швидкість перемішування	Автоматичний тахометр, контрольна панель	Кожну операцію	300 об/хв
	рН	Датчик рН, контрольна панель	Кожну операцію	6,8-7,2
	Активність продукту	Турбідиметричний метод	Кожну операцію	5000 МО/см <sup>3</sup>
ТП5. Виробничий біосинтез Кх 5.2	Аерація	Ротаметр	Кожну операцію	0,4 Vповітря/1 V×хв
ТП5 Виробничий біосинтез Км 5.3	Мікробна чистота культуральної рідини	Мазок	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори, окрім продуцента.
ТП6 Відділення біомаси Кт6.1	Швидкість обертання	Контрольна панель	Кожну операцію	1000 об/хв
ТП7.1 Внесення носія Кт7.1.1	Кількість цеоліту	Ваговий дозатор	Кожну операцію	5% від об'єму культурального фугату
ТП7.2 Перемішування та витримка суміші Кт7.2.1	Температура	Автоматичний регулятор температур	Кожну операцію	28±2 °C

		и		
	Час	Контрольн а панель	Кожну операцію	30–50 хв
ТП8 Відділення імобілізованого ензибіотику Кт 9.1	Швидкість обертання	Контрольн а панель	Кожну операцію	6000 об/хв
	Час перемішування	Контрольн а панель	Кожну операцію	30 хв
ТП9. Сушіння препарату Кт 9.1	Вологість	Універсаль ний вологомір	Кожну операцію	5%
	Температура	Цифровий індикатор температур и	Кожну операцію	$t_{вх} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ $t_{к} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
	Активність ензибіотику	Турбідимет ричний метод	Кожну операцію	30 тис. МО/г

## РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування обраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Основною метою проведення процесу промислового біосинтезу є отримання максимальної кількості ферментного комплексу, продуцентом якого є *S. albus* 2435/М. Однією з необхідних умов проведення даного процесу є забезпечення біологічного агенту необхідною кількістю вуглецевого і азотного субстрату, мікро- та макроелементів з поживного середовища, а також достатньою кількістю кисню для протікання метаболічних процесів в організмі. Це досягається шляхом перемішування і гомогенізації посівної культури з поживним середовищем. Відповідно, для проведення етапу виробничого культивування був обраний біореактор (ферментер) з перемішуючим пристроєм.

Основним параметром, що характеризує ефективність аеробних процесів є поверхня контакту рідини з газом, тому спосіб її формування закладено в основу класифікації ферментерів. Відповідно, в залежності від способу утворення даної поверхні газорідинні ферментери ділять на 3 групи:

- Ерліфтні;
- Струйні;
- З механічним диспергування газу;

Ерліфтні ферментери застосовуються переважно для апаратів великого робочого об'єму, з використанням в якості газової фази повітря, 80% компримованого азоту в якому несуть достатньо кінетичної енергії для забезпечення необхідних умов масообміну і пневмоперемішування культурального поживного середовища. Перевагами даного типу

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Рижкова Т.С.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	70
							109
Керівник		Тодасіччук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

ферментерів є висока експлуатаційна надійність, недоліком – малоінтенсивний масообмін [107]. З урахуванням аналізу сфери використання даного типу ферментерів, та його конструкційних особливостей було визначено, що для отримання біомаси продуцента цільового продукту використання ерліфтного ферментеру є недоцільним, оскільки масштаб виробництва іммобілізованого ензимиотику є недостатньо великим.

Струйні ферментери ще не отримали достатнього поширення у виробничій практиці. Принцип роботи таких препаратів полягає в тому, що потік рідини витікає з насадки і зтягує за собою газ. При падінні струменя на дзеркало рідини і проникненні його всередину відбувається перемішування газу з рідиною і, відповідно, утворення великої кількості міжфазних поверхонь. Перевагами даного типу конструкції ферментерів є велика поверхня міжфазного обміну, висока експлуатаційна надійність та можливість роботи як з використанням повітря, так і чистих газів. Суттєвим недоліком, що унеможливорює використання струйних ферментерів для отримання цільового продукту, є неможливість праці в стерильних умовах [108].

Ферментери з механічним диспергуванням газової фази набули поширення для використання в апаратах номінальним об'ємом  $<100 \text{ м}^3$ . Крім того, вони здатні працювати в стерильних умовах та при надлишкового тиску, за умови герметизації валу перемішуючого пристрою. Даний тип конструкції біореакторів є широко поширеним для вирощування в стерильних умовах мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних речовин [109]. Особливістю такої конструкції є підведення енергії з газовою і рідкою фазами, що дозволяє отримати розвинутий турбулентний потік рідини, за рахунок якого досягається найбільш тонке диспергування газової фази, що при досить високому газовмісті створює велику площу поверхні контакту фаз [110]. Саме тому для проведення виробничого біосинтезу



продуцента іммобілізованого ензигібіотику *S. albus* 2435/М був обраний ферментер з механічним перемішуючим пристроєм і барботером.

Важливим етапом конструювання ферментеру з механічним диспергуванням газу є вибір перемішуючого пристрою, що забезпечує диспергування газових бульбашок, що виходять з барботеру, вплив на бульбашки і колонії за допомогою турбулентних пульсацій, що зменшують дифузійний опір та рівномірне розподілення в рідині газових бульбашок, біомаси та твердих компонентів поживного середовища [111]. Мішалки класифікують в залежності від форми лопатей і виділяють наступні типи:

- Лопатеві мішалки;
- Пропелерні;
- Спеціальні (якірні, гвинтові, шнекові, рамні, ножові та ін.);
- Турбінні.

Лопатеві мішалки зазвичай застосовують для перемішування культуральних рідин низької в'язкості ( $3 \cdot 10^{-3}$  н·с/м<sup>2</sup>); для перемішування взаємно розчинних рідин; зважених твердих частинок в рідині з масовим вмістом їх до 90%; повільного розчинення кристалічних, аморфних або волокнистих речовин; вирівнювання температур; перемішування в процесах кристалізації. В біотехнологічній промисловості сфера застосування мішалок даного типу переважно включає культивування клітин ссавців, комах або інших чутливих до зрушення клітинних ліній, що ростуть в суспензії або на мікроносіях [111].

Пропелерні мішалки часто застосовуються в хімічній та біотехнологічній промисловості з метою інтенсивного перемішування середовищ при низьких затратах енергії. Недоліком такої конструкції перемішуючого пристрою є можливість перемішування лише малов'язких рідин (до 4 н·с/м<sup>2</sup>), невеликих за об'ємом. Крім того, подібна конструкція мішалок не є достатньо придатною для гомогенізації середовища, що складається з рідкою та газової фази. Відповідно, використання пропелерних

мішалок є недоцільним при проведенні промислового культивування з барботуванням.

Рамні та якірні перемішуючі пристрої застосовуються в основному для перемішування в'язких та важких рідин (до  $10 \text{ н}\cdot\text{с}/\text{м}^2$ ) та для суспендування в в'язких середовищах. Мета їх застосування полягає переважно в інтенсифікації теплообміну в апаратах з сорочкою або змійовиками та попередження забруднення поверхонь, що беруть участь в теплопередачі.

Турбінні мішалки застосовують для інтенсивного перемішування і змішування рідин з в'язкістю до  $10 \text{ н}\cdot\text{с}/\text{м}^2$  (для мішалок відкритого типу) і до  $50 \text{ н}\cdot\text{с}/\text{м}^2$  (для закритих мішалок), для тонкого диспергування, швидкого розчинення або виділення опадів у великих обсягах (5 – 6 і більше). Ці мішалки використовують для змучування осадів в рідинах, що містять до 60% твердої фази (мішалки відкритого типу) і більше (мішалки закритого типу), причому максимальні розміри твердих частинок складають до 1,5 мм для мішалок відкритого типу і до 2,5 мм для мішалок закритого типу [108].

Отже, для розробки ферментера для проведення виробничого біосинтезу з використанням поживного середовища на основі меляси була обрана турбінна мішалка відкритого типу.

Для виготовлення ферментеру були обрані два види конструкційних матеріалів:

- Для внутрішніх частин ферментеру, що безпосередньо контактують з продуктом – нержавіюча сталь марки 316L;
- Для складових ферментеру, що не контактують з продуктом – нержавіюча сталь марки 304L;

Сталь AISI 316L – конструкційна кріогенна аустенітна сталь, стійка до корозії в агресивних середовищах, а також до більшості зовнішніх впливів. Сталь 316 L має властивість зберігати цілісність структури при підвищенні і зниженні температур. Особливістю її хімічного складу є наявність на поверхні захисного шару, утвореного сплавом заліза і хрому, що робить її стійкою до механічних, хімічних впливів, а також впливів перепаду

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

температури. Відповідно, такий матеріал буде витримувати етап хімічної стерилізації 40% розчином каустичної соди, а також термічну стерилізацію гострою водяною парою. Даний тип сталі є рекомендованим до використання в медичній та фармацевтичній промисловості [112].

Сталь AISI 304L відноситься до корозійностійких нержавіючих сталей, що відрізняються високим опором міжкристалітної корозії при високих температурах (до 500 °C) і відмінною стійкістю в більшості агресивних середовищ. Особливістю такого типу сталі є підвищений вміст азоту, що дозволяє використовувати її при виготовленні транспортних контейнерів, великих резервуарів і ємкостей та інших металоконструкцій, що вимагають високу розрахункову міцність при мінімальній товщині стінок [113].

## 5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.

Для проведення промислового біосинтезу культури продуцента *S. albus* 2435/М був обраний ферментер об'ємом 2000л з механічним перемішуючим пристроєм (турбінна мішалка) і кільцевим барботером виробника «Biotechno» [115].

Типова конструкція обраного апарату наведена на рис. 5.1. Після подачі в апарат поживного середовища та посівного матеріалу продуцента електродвигун 1 редуктором запускає рух перемішуючого пристрою 9, що обертається зі швидкістю 300 об/хв і забезпечує гомогенізацію компонентів культуральної рідини. Для досягнення оптимального використання потужності приводу перемішуючого пристрою і по периферії апарату встановлені відбиваючі перегородки.

Аерація культуральної рідини здійснюється подачею стерильного повітря через кільцевий барботер. Температура культивування продуцента складає  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , її контроль температурного режиму культивування забезпечується шляхом наявності сорочки 7, в яку подається і відводиться теплоагент.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

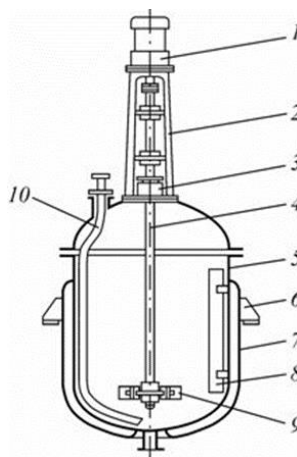


Рисунок 5.1. Типова конструкція апарату з перемішуючим пристроєм.  
(1 – привід апарату; 2 – стійка приводу; 3 – ущільнення валу; 4 – вал мішалки; 5 – корпус; 6 – опора апарату; 7 – рубашка; 8 – відбиваюча перегородка; 9 – мішалка; 10 – труба передавлювання [115].

Розрахунок обраної конструкції включав в себе визначення конструктивних розмірів самого апарату, а також його складових (барботер і мішалка), а також тепловий розрахунок.

Конструктивний розрахунок ферментера

Розрахунок основних розмірів ферментеру [116]:

- Номінальний об'єм:  $V_n = 2000 \text{ л} = 2 \text{ м}^3$ ;
- Коефіцієнт заповнення,  $K_z = 0,7$ ;
- Робочий об'єм за формулою (5.1) становить:

$$V_p = V \cdot K_z$$

$$V_p = 2 \cdot 0,7 = 1,4 \text{ м}^3 ;$$

За ГОСТ 20680-86 серед вертикальних апаратів з механічним перемішуючим пристроєм і верхнім розташуванням приводів було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною кришкою, що знімається (тип 0) [117].

За ГОСТ 20680-86 обираємо наступні параметри корпусу ферментера:

- Внутрішній діаметр:  $D_{вн} = 1400 \text{ мм} = 1,4 \text{ м}$ ;
- Площа поверхні теплообміну рубашки:  $F_p = 3,5 \text{ м}^2$ ;

- Внутрішня поверхня еліптичного днища :  $F_{\text{дн}} = 2,31 \text{ м}^2$ ;
- Товщина стінки еліптичного днища :  $S_{\text{дн}} = 12 \text{ мм} = 0,012 \text{ м}$ ;
- Об'єм еліптичного днища :  $V_{\text{дн}} = 0,419 \text{ м}^3$ ;
- Ємність днища :  $F_{\text{е}} = 0,421 \text{ м}^2$ ;
- Маса днища :  $m_{\text{дн}} = 204,2 \text{ кг}$ ;
- Висота еліптичної частини днища за формулою (5.2) становить:

$$H_{\text{ел}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}$$

$$H_{\text{ел}} = 0,25 \cdot 1,4 = 0,35 \text{ м};$$

- Висота основи еліптичного днища:  $H_{\text{осн}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$
- Повна висота днища за формулою (5.3) становить:

$$H = H_{\text{ел}} + H_{\text{осн}};$$

$$H = 0,35 + 0,04 = 0,39 \text{ м};$$

- Об'єм циліндричної частини ферментера за формулою (5.4) становить:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}};$$

$$V_{\text{ц}} = 2 - 2 \cdot 0,419 = 1,162 \text{ м}^3;$$

- Висота циліндричної частини за формулою (5.5) становить:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2};$$

$$H_{\text{ц}} = \frac{1,162 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,4^2} = 0,755 \text{ м};$$

- Висота рідини в циліндричній частині за формулою (5.6) становить:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot K_3 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2};$$

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot 0,7 \cdot 1,162}{3,14 \cdot 1,4^2} = 0,52 \text{ м};$$

- Висота рівня рідини в реакторі за формулою (5.7) становить:

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{вн}}} + H_{\text{осн}} + h_{\text{в}};$$

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (1,4 - 0,419)}{3,14 \cdot 1,4} + 0,04 + 0,35 = 1,28 \text{ м};$$

- На основі попередньо розрахованих даних визначаємо за формулою (5.8) загальну висоту апарату:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot H;$$

$$H_{\text{заг}} = 0,755 + 2 \cdot 0,39 = 1,535 \text{ м};$$

Розрахунок перемішуючого пристрою [116]:

- Визначаємо діаметр мішалки за формулою (5.9):

$$D_{\text{м}} = D \cdot 0,33;$$

$$D_{\text{м}} = 1,4 \cdot 0,33 = 0,46 \text{ м};$$

Відповідно до АТК 24.201.17-90 обираємо відкриту турбінну мішалку стандартного діаметру 0,45 м, діаметр вала = 0,08 м [118].

Для даного типу мішалок повинні зберігатися наступні співвідношення параметрів:

- $D/D_{\text{м}} = 3:4;$
- $h_{\text{м}}/d_{\text{м}} = 0,2;$
- $h/d_{\text{м}} = 0,4:1;$
- $l/d_{\text{м}} = 0,1;$
- $b/d_{\text{м}} = 0,1;$
- $\xi_{\text{м}} = 8,4;$

Відповідно до вищезазначених вимог визначаємо геометричні розміри обраного перемішуючого пристрою:

- Висота:

$$h_{\text{м}} = D_{\text{м}} \cdot 0,2 = 0,45 \cdot 0,2 = 0,07 \text{ м};$$

- Висота прикріплення:

$$h = D_{\text{м}} \cdot 0,6 = 0,45 \cdot 0,6 = 0,21 \text{ м};$$

- Ширина лопасті:

$$l = D_{\text{м}} \cdot 0,25 = 0,45 \cdot 0,25 = 0,0885 \text{ м};$$

- Висота лопатей:

$$b_{\text{л}} = 0,2 \cdot D_{\text{м}} = 0,2 \cdot 0,45 = 0,09 \text{ м};$$

- Критерій опору:

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

$$\xi_M = 8,4;$$

- Кутова швидкість перемішування за формулою (5.10) становить:

$$\omega = \pi \cdot d_M \cdot n;$$

$$n = 5 \text{ с}^{-1}$$

$$\omega = 3,14 \cdot 0,45 \cdot 5 = 7,065 \text{ м/с};$$

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розраховуємо глибину воронки [119]:

- Визначаємо центробіжний критерій Рейнольдса за формулою (5.11):

$$Re_{\Pi} = \frac{\rho_c \cdot n \cdot D_M^2}{\mu_c};$$

$$Re_{\Pi} = \frac{1056 \cdot 5 \cdot 0,45^2}{0,00134} = 797910 = 7,97 \cdot 10^5$$

- Параметр висоти завантаження апарата за формулою (5.12) становить:

$$\gamma(\Gamma) = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{1,28}{1,4} + 1 = 8,310;$$

- Параметр гідравлічного опору мішалки E за формулою (5.13) становить:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_{\Pi}^{0,25}};$$

$$E = \frac{8,31}{8,4 \cdot 1 \cdot (7,87 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,03;$$

де  $\xi_M$  – критерій опору; z – кількість мішалок на валу.

- Глибина воронки в реакторі без відбиваючих перегородок за формулою (5.14) становить:

$$H_B = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_M^2}{2};$$

$$H_B = \frac{13 \cdot 5^2 \cdot 0,45^2}{2} = 32,9 \text{ м};$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми в залежності від E і типу мішалки.

- Розраховуємо гранично допустиму глибина воронки за формулою (5.15):

$$H_{гр} = H_p - h;$$

$$H_{гр} = 1,28 - 0,21 = 1,07 \text{ м};$$

Так як  $h_v > H_{гр}$  необхідне встановлення відбиваючих перегородок.

- Визначаємо ширину відбиваючої перегородки:

$$b = 0,1 \cdot d_m;$$

$$b = 0,1 \cdot 450 = 45 \text{ мм} = 0,045 \text{ м};$$

- Потужність, що витрачається на перемішування визначається за формулою (5.16):

$$N_m = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_m^3;$$

де  $K_N$  – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса;

За графіком нормалі знаходимо значення  $K_N = f(Re_{ц})$  :

$$K_N = 10$$

Тоді потужність, що споживається, становить:

$$N_m = 10 \cdot 1056 \cdot 5^3 \cdot 0,9^5 = 119601 \text{ В} = 119,6 \text{ кВт};$$

- Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевому ущільненні за формулою (5.18) становить:

$$N_{ущ} = 6020 \cdot d_v^{1,3};$$

$$N_{ущ} = 6020 \cdot 0,08^{1,3} = 225,74 \text{ Вт} = 0,225 \text{ кВт};$$

де  $d_v$  – діаметр валу мішалки.

- Потужність приводу за формулою (5.19) становить:

$$N_{ел} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N \cdot N_{ущ}}{\phi};$$

$$K_n = \left( \frac{H_p}{D} \right)^{0,5};$$

$$K_n = \left( \frac{1,28}{1,4} \right)^{0,5} = 0,95;$$



$$N_{\text{ел}} = \frac{1 \cdot 0,95 \cdot 1,1 \cdot 119,601 \cdot 0,225}{0,9} = 31,24 \text{ кВт};$$

де  $K_H$  – коефіцієнт рівня рідини в апараті;  $K_i$  – коефіцієнт, що враховує наявність в апараті внутрішніх пристроїв ( $K_i=1,1$ );  $\varphi$  – ККД двигуна ( $\varphi=0,85..0,9$ ).

Розрахунок барботеру

- Висота барботажного пристрою:

$$h_n = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м};$$

- Діаметр, на якому розміщені отвори в барботері:

$$D_0 = 0,5 \cdot d_m = 0,5 \cdot 0,45 = 0,225 \text{ м};$$

- Діаметр отвору барботера:  $d_0 = 2 - 5 \text{ мм}$ ;

- Відстань від мішалки до барботеру:

$$h_r = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м};$$

Згідно рекомендацій, на 1 одиницю об'єму культуральної рідини за 1 хв витрачається 0,4 одиниць об'єму повітря. Отже, на робочий об'єм  $1,4 \text{ м}^3$  витрати повітря складають  $0,56 \text{ м}^3/\text{хв} = 0,784 \text{ м}^3/\text{хв} = 0,013 \text{ м}^3/\text{с}$ .

- Швидкість газу в отворах  $W_n = 25 \text{ м/с}$ .
- Внутрішній діаметр барботеру за формулою (5.19) становить:

$$d_{\text{бвн}} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_r}{W_o \cdot \pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,013}{25 \cdot 3,14}} = 0,025 \text{ м}$$

- Середній діаметр барботера за формулою (5.20) становить:

$$D_{\text{ср}} = 6 \cdot d_{\text{бвн}} = 6 \cdot 0,025 = 0,15 \text{ м};$$

- Кількість отворів в барботері за формулою (5.21) становить:

$$Z = \frac{4 \cdot V_r}{W_o \cdot \pi \cdot d_0^2} = \frac{4 \cdot 0,013}{25 \cdot 3600 \cdot 3,14 \cdot 0,002^2} = 165 \text{ шт.};$$

де  $d_0$  – діаметр газорозподільних пристроїв ( $d_0 = 2 \text{ мм}$ )

- Кількість отворів в 1 ряду за формулою (5.22) становить:

$$Z_1 = \frac{\pi \cdot D_0}{t} = \frac{3,14 \cdot 0,225}{0,025} = 28 \text{ шт.};$$

де  $t$  – крок між отворами (прийmemo  $t=25$  мм).

- Кількість рядів за формулою (5.23):

$$n = \frac{z}{z_1} = \frac{165}{28} = 6 \text{ шт.};$$

- Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера за формулою (5.24) становить:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} \cdot d_0^2 \cdot z = \frac{3,14}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 165 = 0,00051 \text{ м}^2;$$

- Крок розміщення отворів барботеру:

$$\tau = \frac{\pi \cdot D_{\text{ср}}}{z} = \frac{3,14 \cdot 0,15}{165} = 0,002 \text{ м.}$$

Тепловий розрахунок ферментера

Вихідні дані для розрахунку:

- Густина поживного середовища:  $\rho_{\text{пс}} = 1056 \text{ кг/м}^3$ ;
- Температура поживного середовища:  $t_{\text{пс}} = t_{\text{пм}} = t_{\text{кр}} = 28^\circ\text{C}$ ;
- Тривалість культивування  $\tau = 60 \text{ год} = 216000 \text{ с}$ ;
- Інтенсивність аерації:  $V_{\text{г}} = 0,784 \text{ м}^3/\text{год}$ ;
- Теплоємність повітря:  $C_{\text{пов}} = 1000 \text{ Дж}/(\text{кг} \cdot \text{K})$  ;
- Теплоємність води:  $C_{\text{т}} = 4200 \text{ Дж}/(\text{кг} \cdot \text{K})$  ;
- Розраховуємо густину повітря за формулою (5.26):

$$\rho_{\text{г}} = 1,29 \cdot \frac{273}{t_{\text{г}} + 273};$$

$$\rho_{\text{г}} = 1,29 \cdot \frac{273}{28 + 273} = 1,17 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3};$$

- Теплоємність поживного середовища за формулою (5.27) становить:

$$c_{\text{р}} = c_{\text{пс}} = c_{\text{пм}} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{\text{пс}});$$

$$c_{\text{р}} = c_{\text{пс}} = c_{\text{пм}} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 15 - 28) = 3821 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{K}};$$

- Густина поживного середовища за формулою (5.28) становить:

$$\rho_{\text{р}} = \rho_{\text{пм}} = 1007,3 + 4,11 \cdot (x - 0,11 \cdot t_{\text{пс}});$$

$$\rho_{кр} = \rho_{пм} = 1007,3 + 4,11 \cdot (15 - 0,11 \cdot 28) = 1056,29 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3};$$

- Коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища за формулою (5.29) становить:

$$\mu_p = (2,7 + 0,192 \cdot x) \cdot t_{пс}^{-0,426};$$

$$\mu_{кр} = (2,7 + 0,192 \cdot 15) \cdot 28^{-0,426} = 1,35 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

- Коефіцієнт теплопровідності поживного середовища за формулою (5.30) становить:

$$\lambda_{пс} = \lambda_{пм} = 0,512 + 0,00095 \cdot |t_{пс} - 40|;$$

$$\lambda_{пс} = \lambda_{пм} = 0,512 + 0,00095 \cdot |28 - 40| = 0,52 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}};$$

- Коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища за формулою (5.31) становить:

$$\nu_{пс} = \nu_{пм} = \frac{\mu_p}{\rho_p} = \frac{1,35 \cdot 10^{-3}}{1056,29} = 1,27 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}};$$

- Маса повітря за формулою (5.32) становить:

$$M_{пов} = \rho_{г} \cdot V_{г} = 1,17 \cdot 0,013 = 0,015 \text{ кг};$$

- Маса культуральної рідини за формулою (5.33) становить:

$$M_{кр} = \rho_p \cdot V_p = 1056 \cdot 1,4 = 1478 \text{ кг};$$

- Маса посівного матеріалу за формулою (5.34) становить:

$$M_{пм} = 0,1 \cdot M_{кр} = 0,1 \cdot 1478 = 147,8 \text{ кг};$$

- Маса поживного середовища за формулою (5.35) становить:

$$M_{пс} = M_{кр} - M_{пм} = 1478 - 147,8 = 1330,2 \text{ кг};$$

Розрахунок теплового балансу

Надходження теплоти в апарат відбувається з:

- поживним середовищем за формулою (5.36):

$$E_{пс} = M_{пс} \cdot C_{пс} \cdot t_{пс};$$

$$E_{пс} = 1330,92 \cdot 3821 \cdot 28 = 142,4 \text{ МДж};$$

- з посівним матеріалом за формулою (5.37):

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} ;$$

$$E_{\text{пм}} = 147,8 \cdot 3821 \cdot 28 = 15,82 \text{ МДж};$$

- з повітрям за формулою (5.38):

$$E_{\text{пов}} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов п}} \cdot \tau ;$$

$$E_{\text{пов}} = 0,015 \cdot 1000 \cdot 38 \cdot 216000 = 114,9 \text{ МДж}$$

- з теплою, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від повітря за формулою (5.39):

$$E_{\text{дис2}} = V_{\text{г}} \cdot \Delta p \cdot \tau ;$$

$$E_{\text{дис2}} = 0,013 \cdot 13260 \cdot 216000 = 37,23 \text{ МДж};$$

$$\Delta p = \rho_{\text{р}} \cdot H_{\text{р}} \cdot g ;$$

$$\Delta p = 1056 \cdot 1,28 \cdot 9,81 = 13260 \text{ Дж};$$

- з теплою, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішувачів за формулою (5.40):

$$E_{\text{дис1}} = N \cdot \tau ;$$

$$E_{\text{дис1}} = 119,6 \cdot 216000 = 25,8 \text{ МДж};$$

- з теплою реакції:

Кількість сухих речовин:

$$1478 \cdot 0,15 = 221,3 \text{ кг}$$

Вміст цукру в мелясі складає 50%, тому:

$$221,3 \cdot 0,5 = 110,9 \text{ кг цукру}$$

Оскільки за 1 кг згорання цукру виділяється 3744 ккал тепла, то теплота реакції за формулою (5.41) становить:

$$E_{\text{р}} = m_{\text{ц}} \cdot \frac{r}{\tau} ;$$

$$E_{\text{кр}} = 110,9 \cdot 16,5/60 = 30,5 \text{ МДж};$$

, де  $r = 16,5 \text{ МДж/кг}$ .

- Сумарна кількість надходження теплоти ферментера за формулою (5.42):

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пн}} + E_{\text{пов1}} + E_{\text{дис1}} + E_{\text{дис2}} + E_{\text{р}} ;$$

$$\sum E_{\text{надх}} = 142,4 + 15,82 + 114,9 + 37,23 + 25,8 + 30,5 = 366,65 \text{ МДж};$$

Витрати теплоти в апараті відбуваються з:

- з культуральною рідиною (за формулою (5.43)):

$$E_{\text{кр}} = M_{\text{р}} \cdot C_{\text{р}} \cdot t_{\text{р}};$$

$$E_{\text{кр}} = 1478 \cdot 3821 \cdot 28 = 152,34 \text{ МДж};$$

- з парою (за формулою (5.44)):

$$E_{\text{пов2}} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{р}};$$

$$E_{\text{пов2}} = 0,015 \cdot 1000 \cdot 28 = 0,00042 \text{ МДж};$$

$r$  – теплота пароутворення, 2260 Дж/моль

- з повітрям (за формулою (5.45)):

$$E_{\text{пов2}} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{р}};$$

$$E_{\text{пов2}} = 0,015 \cdot 1000 \cdot 28 = 0,00042 \text{ МДж};$$

- Визначаємо втрати в навколишнє середовище за формулою (5.46):

$$E_{\text{втр}} = 0,2 \cdot (E_{\text{к}} + E_{\text{пар}} + E_{\text{пов2}});$$

$$E_{\text{втр}} = 0,2 \cdot (13062 + 15,3 + 104,65) = 30,53 \text{ МДж};$$

- Сумарні втрати:

$$\sum E_{\text{втр}} = E_{\text{кр}} + E_{\text{пов2}} + E_{\text{втр}};$$

$$\sum E_{\text{втр}} = 152,34 + 104,65 + 439,9 = 182,87 \text{ МДж};$$

- Рівняння теплового балансу:

$$E_{\text{пс}} + E_{\text{пн}} + E_{\text{пов1}} + E_{\text{дис1}} + E_{\text{дис2}} + E_{\text{р}} + E_{\text{т1}} = E_{\text{к}} + E_{\text{пар}} + E_{\text{пов2}} + E_{\text{втр}} + E_{\text{т2}};$$

$$E_{\text{т1}} - E_{\text{т2}} = M_{\text{т}} \cdot C_{\text{т}} \cdot (t_{\text{т1}} - t_{\text{т2}}) = E_{\text{втр}} - E_{\text{надх}};$$

$$E_{\text{т1}} - E_{\text{т2}} = 366,65 - 182,87;$$

$$M_{\text{т}} \cdot C_{\text{т}} \cdot (t_{\text{т1}} - t_{\text{т2}}) = 183,78;$$

$E_{\text{випр}} < E_{\text{надх}}$ , відповідно середовища в апараті необхідно охолоджувати. Визначаємо початкову та кінцеву температуру теплоносія. Оскільки у ферментері відбувається процес нагрівання, то:

$$t_{\text{кр}} - \Delta t_{\text{ср}} = t_{\text{T}};$$

Де  $\Delta t_{\text{ср}} = 10^{\circ}\text{C}$ . Відповідно:

$$t_{\text{T}} = t_{\text{кр}} - 10^{\circ}\text{C} = 28 - 10 = 18^{\circ}\text{C};$$

$$t_{\text{T1}} = t_{\text{ср}} + 1^{\circ}\text{C} = 18 + 1 = 19^{\circ}\text{C};$$

$$t_{\text{T1}} = t_{\text{ср}} - 1^{\circ}\text{C} = 18 - 1 = 17^{\circ}\text{C};$$

Тоді:

$$M_{\text{T}} \cdot C_{\text{T}} \cdot (19 - 17) = 183,78;$$

$$M_{\text{T}} \cdot C_{\text{T}} = 91,89 \text{ МДж};$$

$$M_{\text{T}} = \frac{M_{\text{T}} \cdot C_{\text{T}}}{C_{\text{T}}} = \frac{91890000}{4200} = 21878,6 \text{ кг}$$

- Масові витрати теплоносія за формулою (5.47) становлять:

$$G_{\text{T}} = \frac{M_{\text{T}}}{\tau \cdot 3600} = \frac{21878,6}{60 \cdot 3600} = 0,1 \frac{\text{кг}}{\text{с}};$$

$$W_{\text{T}} = \frac{G_{\text{T}}}{1000} = \frac{0,1}{1000} = 0,1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Розрахунок параметрів тепловіддачі та теплопередачі.

Для визначення поверхні теплообміну знаходимо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у ферментері та коефіцієнт теплопередачі.

- Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія за формулою (5.48) становить:

$$a = \frac{D_{\text{с}} - 2 \cdot \delta_{\text{ст}} - D}{2};$$

де  $\delta_{\text{ст}} = 0,01 \text{ м}$  – товщина стінки,  $D_{\text{с}} = 1,7 \text{ м}$  – діаметр сорочки ферментера,

$$a = \frac{1,7 - 2 \cdot 0,01 - 1,4}{2} = 0,14 \text{ м};$$

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,14 = 0,01 \text{ м};$$

- Еквівалентний діаметр за формулою (5.49) становить:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,14 \cdot 0,01}{0,14 + 0,01} = 0,019 \text{ м};$$

- Середній діаметр ферментера за формулою (5.50) становить:

$$D_{\text{ср}} = D_{\text{с}} - a = 1,7 - 0,14 = 1,56 \text{ м};$$

- Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu_{\text{с}} = 1,35 Re_{\text{с}}^{0,59} \cdot Pr_{\text{с}}^{0,38} \left( \frac{\mu_{\text{с}}}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14};$$

- Критерій Рейнольдса за формулою (5.51) становить:

$$Re_{\text{с}} = \frac{d_{\text{м}}}{\nu_{\text{с}}} (n \cdot d_{\text{м}} + 4 \cdot W_{\text{г}});$$

$$W_{\text{г}} = \frac{4V_{\text{г}}}{\pi D^2} = \frac{4 \cdot 0,013}{3,14 \cdot 1,4^2} = 0,011 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Тоді:

$$Re_{\text{с}} = \frac{0,45}{1,27 \cdot 10^{-6}} (0,67 \cdot 0,45 + 4 \cdot 0,011) = 1,2 \cdot 10^5;$$

- Критерій Прандтля за формулою (5.52) становить:

$$Pr_{\text{с}} = \frac{\mu_{\text{с}} \cdot c_{\text{с}}}{\lambda_{\text{с}}};$$

$$Pr_{\text{с}} = \frac{1,34 \cdot 10^{-3} \cdot 3821}{0,52} = 9,9;$$

Тоді:

$$Nu_{\text{с}} = 1,35 \cdot (1,2 \cdot 10^5)^{0,59} \cdot 9,9^{0,38} = 3248,7;$$

- Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить за формулою (5.53):

$$\alpha_{\text{с}} = \frac{Nu_{\text{с}} \cdot \lambda_{\text{с}}}{D} = \frac{3248,7 \cdot 0,52}{1,4} = 1206,65 \text{ (Вт/м}^2 \cdot \text{К)}$$

Визначаємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія.

- Об'ємні витрати теплоносія за формулою (5.54):

$$V_{\text{т}} = \frac{G_{\text{т}}}{\rho_{\text{т}}} = \frac{0,1}{998} = 0,0001 \frac{\text{м}^3}{\text{с}};$$

де  $\rho_T = 998 \text{ кг/м}^3$  – густина теплоносія;

- Швидкість руху теплоносія за формулою (5.55) становить:

$$W_T = \frac{V_T}{a \cdot b} = \frac{0,0001}{0,14 \cdot 0,01} = 0,07 \frac{\text{м}}{\text{с}};$$

- Критерій Рейнольдса за формулою (5.56) становить:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,07 \cdot 0,019}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 1322,8;$$

де  $\nu_T = 1,01 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$  – кінематична в'язкість теплоносія;

- Так як  $Re_T < 10000$ , то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням:

$$Nu_T = 0,037 \cdot Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43};$$

- Критерій Прандтля за формулою (5.52) становить:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T} = \frac{1,000 \cdot 10^{-3} \cdot 4190}{0,599} = 6,99;$$

де  $\mu_T = 1,000 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$  – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія;

$C_T = 4190 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$  – питома теплоємність теплоносія;

$\lambda_T = 0,599 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$  – питома теплопровідність теплоносія;

Тоді за формулою:

$$Nu_T = 0,037 \cdot (1322,8)^{0,8} \cdot 6,99^{0,43} = 26,8;$$

- Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці за формулою (5.57) становить:

$$\alpha_T = \frac{Nu_T \cdot \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{26,8 \cdot 0,599}{0,019} = 861,013 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

- Коефіцієнт теплопередачі становить за формулою (5.58):

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{1206,65} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{861,013}} = 382,38 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

де  $\lambda_{\text{ст}} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$  – теплопровідність стінки.

- Розрахункова поверхня теплообміну за формулою (5.59) становить:



$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau_{пр}} = \frac{91,89 \cdot 10^6}{382,38 \cdot 10 \cdot 216000} = 0,111 \text{ м}^2;$$

- Визначаємо дійсну поверхню теплообміну за формулою (5.60):

$$F_d = \pi \cdot D \cdot H_c;$$

$$H_c = H_p - h_{дн} = 1,28 - 0,39 = 0,89 \text{ м};$$

Тоді:

$$F_d = 0,89 \cdot 3,14 \cdot 1,4 = 3,91 \text{ м}^2$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F_p < F_d$$

$$0,111 \text{ м}^2 < 3,91 \text{ м}^2$$

Можна зробити висновок, що поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

### 5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

З метою забезпечення постійного стабільного функціонування виробничого ферментеру необхідно здійснювати ряд допоміжних операцій. Ці процеси що включають в себе подачу всіх необхідних компонентів для проведення промислового біосинтезу, а саме поживного середовища, посівного матеріалу, води для контролю теплообміну в процесі культивування та для охолодження культуральної рідини після. Для проведення вищезазначених процесів застосовується допоміжне обладнання – електронні відцентрові насоси.

Відцентровий насос перекачує рідину, завдяки тиску, яке створюється внаслідок дії лопатей робочих коліс. Принцип роботи такого насоса досить простий: робоче колесо обертається на ведучому валу навпроти всмоктуючого патрубка. Усередині робочого каналу створюється відцентрова сила, яка направляє рідину від робочого колеса, створюючи розрідження всередині нього. Це призводить до подальшого всмоктування рідини і тим самим замиканню циклу підйому/подачі рідини (рис. 5.2).

Для процесу подачі поживного середовища на етап виробничого біосинтезу був обраний відцентровий насос типу 5X – 12E – 1а. Насос призначений для перекачування хімічно активної робочої рідини з наступними характеристиками [121]:

- Густина – до  $1850 \text{ кг/м}^3$ ;
- В'язкість – до  $30 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ ;
- Розмір твердої фази – до  $0,2 \text{ мм}$ ;
- Температура робочої рідини в межах від  $-40^\circ\text{C}$  до  $+70^\circ\text{C}$ ;

Основні характеристики насосу:

- Подача:  $12,5 \text{ м}^3/\text{год}$ ;
- Напор:  $20 \text{ м}$ ;
- Частота обертання:  $2900 \text{ об/хв}$ ;
- Допустимий кавітаційний запас:  $3,5 \text{ м}$ .

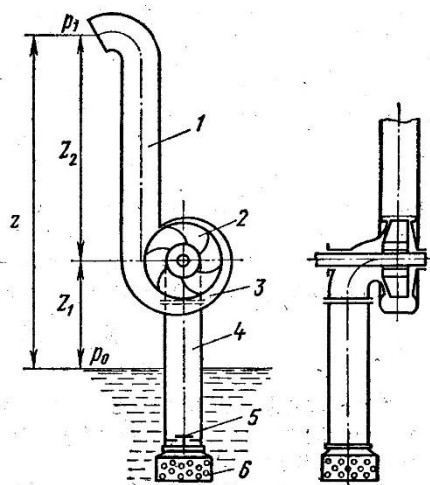


Рисунок 5.2. Будова відцентрового насосу (1 – трубопровід; 2 – робоче колесо; 3 – спіральна камера; 4 – всмоктувальна труба; 5 – прийомний клапан; 6 – фільтр) [121].

#### 5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Безпечне ведення технологічного процесу повинне забезпечуватися організацією належного обслуговування апарату і постійним контролем з боку експлуатаційного персоналу за ходом технологічного процесу. Безпека конструкції виробничого обладнання забезпечується [122]:

- вибором принципів дії і конструктивних рішень, джерел енергії та характеристик енергоносіїв, параметрів робочих процесів, системи управління і її елементів;
- мінімізацією споживаної і накопичуваної енергії при функціонуванні обладнання;
- вибором комплектуючих виробів і матеріалів для виготовлення конструкцій, а також застосовуваних при експлуатації;
- вибором технологічних процесів виготовлення;
- застосуванням вбудованих в конструкцію засобів захисту працюючих, а також засобів інформації, що попереджають про виникнення небезпечних (у тому числі пожежовибухонебезпечних) ситуацій;

Вимоги безпеки до виробничого обладнання конкретних груп, видів, моделей розробляються з урахуванням призначення, виконання та умов його експлуатації. Відповідно до ГОСТ 31833-2012 вимоги безпеки до ферментерів є наступними:

- Ферментатори повинні бути оснащені витяжними трубами, перетин яких має повністю забезпечувати видалення повітря, що подається на аерацію, з робочих приміщень в атмосферу.
- Пара після стерилізації ферментаторів, комунікацій і арматури повинна відводитися в атмосферу поза будівлями.
- Ферментатори повинні бути оснащені контрольно-вимірювальними приладами для визначення рН середовища, температури середовища, рівня рідини в апараті та ін., згідно з технологічною схемою ведення процесу.
- Забороняється завантаження кислоти вручну. Для подачі кислоти повинна бути передбачена самостійна кислотна лінія.
- Відбір проб з ферментаторів повинен проводитися способами, що виключають контакт обслуговуючого персоналу з культуральними рідинами.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Всі роботи з ферментаторі повинні проводитися відповідно до регламентів та експлуатаційними документами, затвердженими в установленому порядку.

Вищезазначені умови безпеки при праці з біореакторами пов'язані з тим, що особливістю роботи з даним типом обладнання, з точки зору біологічної безпеки, є підвищений, у порівнянні з атмосферним, тиск повітря в ферментерах в момент посіву культури, відбору проб матеріалу і протягом всього процесу вирощування глибинним методом. Це створює реальну загрозу для працюючого персоналу внаслідок викиду в навколишнє середовище бактеріального аерозолі – суспензії, з рідкими або твердими частинками, що містять мікроорганізми. Крім того, при експлуатації установок виникає проблема деконтамінації відпрацьованого повітря, що використовувалося для барботування живильного середовища в процесі культивування [123].

Небезпеку витоку продуктів реакції або випуску аерозолів регулюють декількома способами. Для моніторингу та контролю системи, а також для додавання поживних сумішей, кисню і виведення двоокису вуглецю необхідний доступ в біореактор. Щоб запобігти забрудненню культури, отвори для доступу повинні бути герметичні або забезпечені фільтрами. Фільтрація випускаємих газів здійснюється для захисту робітників від аерозолів, що утворюються під час культивування або ферментації. Крім того, апаратне глибинне культивування в біореакторах проводиться тільки в умовах розрідження під вакуумом. Категорично забороняється створювати надмірний тиск в порожнині апаратів для передавлювання культури, аерування та відбору проб.

Біореактори повинні бути оснащені системами внесення посівної культури і відбору проб, та системою очистки відпрацьованого повітря. У разі якщо біореактори встановлені стаціонарно, вони повинні бути додатково оснащені матеріальними трубопроводами з нержавіючої сталі і аварійним

збіркою культури з обсягом, відповідним обсягом реактора. При необхідності в нього переноситься бактеріальна маса для подальшої інактивації.

Іншим типом можливої небезпеки при обслуговування даного є випадки поразки електричним струмом, дотик до частин, металевих корпусів або кожухів електроустаткування і відключених ділянок, що випадково потрапили під напругу і .т.п. Тому необхідно строго дотримувати заходи електробезпеки (заземлення, занулення, захисне відключення, огорожі, ізоляція, індивідуальні засоби захисту і .т.п.). До призначення на роботу працівники зобов'язані пройти спеціальну підготовку і навчання на робочому місці. Обов'язкова перевірка знань за правилами технічної експлуатації систем водопостачання і водовідведення населених місць, правилами техніки безпеки, змістом виробничих і посадових інструкцій, правилами технічної експлуатації і безпеки обслуговування електроустановок промислових підприємств [124].

Обов'язковою вимогою при роботі з ферментерами є етап очищення відпрацьованого повітря, а також рідких викидів. Очистка відпрацьованого повітря з мікробіологічного виробництва найчастіше здійснюється з використанням скрубєрів Вентурі. Установка має трубу Вентурі, призначену для коагуляції дрібних твердих частинок, інерційного препарату та відцентрових скрубєрів, в яких укрупнені частинки та краплі рідини відділяються від газу.

Із виробничих апаратів повітря вентилятором подається в трубу Вентурі, де змішується з водою. В апараті відбувається відділення крапель рідини від газу. Із інерційного апарата суміш газу, води і укрупнених частинок продукту надходить у відцентрові скрубєри, де відбувається кінцеве відділення частинок води від газу. Газ надходить вгору, решта – донизу в збірник. Зібрана вода подається насосом знову в трубу Вентурі (рис. 5.3) [117].

Стічні води, що утворюється після культивування продуцента можуть містити як залишки мінеральних солей, так і органічні компоненти, що

					ДП 6213. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

включають залишки мікроорганізмів. В промисловості використовують декілька способів очистки стоків. Спочатку проводять механічне очищення: проціджування крізь сітки, фільтрування, відстоювання, оброблення в гідроциклонах, флотацію. Ступінь очищення після механічної очистки складає 50 – 70%.

Подальше очищення стоків від органічних і неорганічних залишків може відбуватися наступним чином:

- Хімічне очищення – додавання до стоків реактивів для осадження домішок або виділення газів;
- Фізико-хімічне очищення – шляхом коагуляції флокуляції, сорбції. Як коагулятор застосовують сульфат алюмінію, також поширеним є використання активованого вугілля в якості сорбента.
- Біологічне очищення – утилізація мікроорганізмами залишків органічних речовин [117].

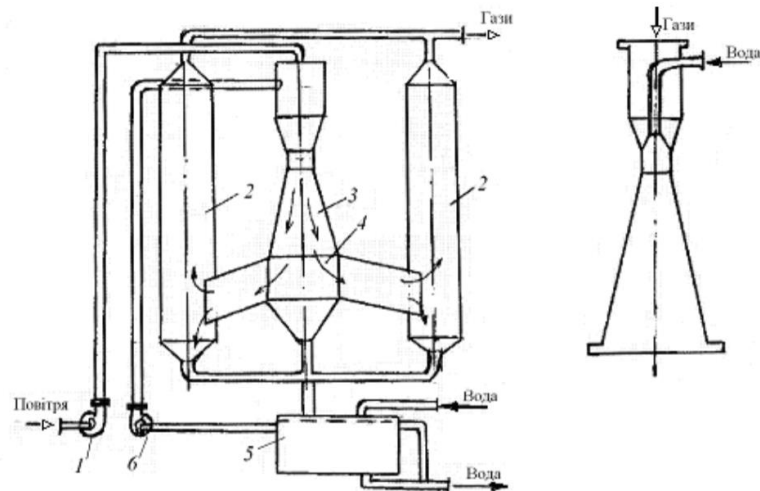


Рисунок 5.3. Установа для очищення повітря і скрубер Вентурі (1 – вентилятор; 2 – відцентрові скрубери; 3 – труба Вентурі; 4 – інерційний апарат; 5 – збірник; 6 – насос) [117].

## ВИСНОВКИ

1. В дипломному проєкті розроблено технологію виробництва іммобілізованого ензиміотику косметичного призначення з використанням продуценту *Streptomyces albus* 2435/М із біосинтетичною активністю 5000 МО/мл культуральної рідини.

2. На основі аналізу методів селекцій була запропонована схема отримання продуценту з використанням індукованого мутагенезу, що передбачає обробку вихідного штаму хімічним мутагеном N-метил-N-нітрозометилсечовиною у концентрації 30 мкг/мл впродовж 2 год.

3. З урахуванням фізіолого-біохімічних особливостей продуценту *S. albus* 2435/М обрано поживні середовища оптимізованого складу для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу, на основі меляси та соєвого борошна. Були визначені раціональні параметри культивування: температура  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , перемішування при 300 об/хв, тривалість 60 год, аерація  $0,4 V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}} \times \text{хв}$ .

4. Для виділення ензиміотику запропоновано використання адсорбційної іммобілізації на цеоліті, що дозволяє одночасно отримати готову форму з підвищеною стабільністю продукту та розширеним спектром регенеративних властивостей.

5. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для стадії виробничого біосинтезу був обраний та розрахований ферментер з механічним перемішуючим пристроєм і кільцевим барботером об'ємом 2000 л.

6. У відповідності до вимог до готової форми, розроблені технологічна і апаратурна схеми виробництва ензиміотику косметичного призначення активністю 30 тис.МО/г, в поліетиленових пакетах по 0,5 кг.

					ДП 6213. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Рижкова Т.С.			ДОДАТКИ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	109
							109
Керівник		Тодосічук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							